

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-503307

(43) 公表日 平成9年(1997)3月31日

(51) Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	
G 0 1 N 27/327		0275-2 J	G 0 1 N 27/30	3 5 1
C 1 2 Q 1/68		9453-4 B	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 27/27		0276-2 J	G 0 1 N 33/50	P
27/333		0276-2 J	33/566	
33/50		0275-2 J	27/30	3 5 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 131 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平8-504426	(71) 出願人	ナノゲン、インコーポレイテッド アメリカ合衆国92121カリフォルニア州、 サンディエゴ、パシフィック・センター・ コート10398番
(86) (22) 出願日	平成7年(1995)7月5日	(72) 発明者	ヘラー、マイケル・ジェイ アメリカ合衆国92024カリフォルニア州、 エンシニタス、ホーク・ビュー・ドライブ 1614番
(85) 翻訳文提出日	平成8年(1996)3月7日	(72) 発明者	チュー、ユージン アメリカ合衆国92103カリフォルニア州、 サンディエゴ、ラーク・ストリート3527番
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 5 / 0 8 5 7 0	(74) 代理人	弁理士 青山 葆 (外1名)
(87) 国際公開番号	W O 9 6 / 0 1 8 3 6		
(87) 国際公開日	平成8年(1996)1月25日		
(31) 優先権主張番号	0 8 / 2 7 1 , 8 8 2		
(32) 優先日	1994年7月7日		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, BR, CA, CN, F I, J P, N Z		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 分子生物学的分析用および診断用の自己アドレス可能な自己組立て超小型電子システムおよびデバイス

(57) 【要約】

自己アドレス可能で、自己アセンブリ超小型電子方式デバイスを設計し製造して、複数工程かつ複合した分子生物学的反応を顕微鏡形式で有効に行い制御する。これらの反応には、核酸ハイブリダイゼーション、抗体/抗原反応、診断および生体高分子の合成が含まれる。該デバイスは、微細写真平板およびマイクロマシーン加工の両方の技術を用いて製造することができる。該デバイスは、特異的微細-位置への特異的結合体の輸送および付着を電子工学的に制御することができる。アドレスされた特異的微細-位置における分析物または反応物の輸送および反応を該デバイスは優先的に制御することができる。該デバイスは、分析物および反応物を濃縮し、非-特異的結合分子を除去し、DNAハイブリダイゼーション反応に厳格な制御を供し、かつ分析物の検出を改善することができる。該デバイスは、電子工学的に複製することができる。

## 【特許請求の範囲】

## 1. 基板；

電極、該電極は該基板によって支持され；

該電極に作動可能に連結した電流源；および

該電極に隣接した付着層よりなり、

ここに、該層は対イオンに対して浸透性であるが、該電極を絶縁できるかまたはそれに結合できる分子に対しては浸透性ではなく、かつ該層はマクロ分子に付着できることを特徴とする電子工学的に自己アドレス可能なデバイス。

2. さらに浸透層よりなり、該浸透層が該付着層と該電極との間に設けられる請求項1記載の電子デバイス。

3. 該電流源が直流電流源よりなる請求項1記載の電子デバイス。

4. 該基板がケイ素、ガラス、二酸化ケイ素、プラスチックおよびセラミックよりなる群から選択されるメンバーからなる請求項1記載の電子デバイス。

5. 該基板がベースおよびその上に存在する絶縁材よりなる請求項1記載の電子デバイス。

6. 該ベースがケイ素、ガラス、二酸化ケイ素、プラスチックおよびセラミックよりなる群から選択されるメンバーである請求項5記載の電子デバイス。

7. 該ベースがケイ素よりなる請求項5記載の電子デバイス。

8. 該絶縁材が二酸化ケイ素よりなる請求項5記載の電子デバイス。

9. 該基板が回路パターンまたは回路ボードよりなる請求項1記載の電子デバイス。

10. 該電極が荷電マクロ分子を該付着層まで移動させることができる請求項1記載の電子デバイス。

11. 該電極が、同時に、荷電した第1のマクロ分子を該付着層まで移動させることができ、かつ該第1のマクロ分子に対して反対の電荷を有する第2のマクロ分子を該付着層から除去できる請求項1記載の電子デバイス。

12. 該浸透層がアミノプロピルトリエトキシシランよりなる請求項2記載の電子デバイス。

13. さらに、該浸透層と該電極との間に設けた緩衝液溜めよりなる請求項2記載の電子デバイス。

14. 該マクロ分子の該付着層への付着が該電極を絶縁しない請求項1記載の電子デバイス。

15. 該電極がアルミニウム、金、銀、スズ、銅、白金、パラジウム、炭素、および半導体材料よりなる群から選択される材料からなる請求項1記載の電子デバイス。

16. 該電極がアルミニウム、金、銀、スズ、銅、白金、パラジウム、炭素、および半導体材料よりなる群から選択される材料からなる請求項1記載の電子デバイス。

17. 該付着層に対する結合物質の付着が該電極を絶縁しない請求項1記載の電子デバイス。

18. 基板；

複数の電極、該電極の各々は該基板上に設けられ；

該複数の電極に作動可能に連結した電流源；および

該各電極に隣接した付着層よりなり、

ここに、該層は対イオンに対して浸透性であるが、該各電極を絶縁できるかまたはそれに結合できる分子に対しては浸透性ではなく、かつ該層がマクロ分子に付着できることを特徴とする電子工学的に自己アドレス可能なデバイス。

19. さらに、該電流源を該複数の電極に連結するスイッチ・コントローラーよりなる請求項18記載の電子デバイス。

20. さらに、該付着層と該各電極との間に設けた浸透層よりなる請求項18記載の電子デバイス。

21. 該各電極がアルミニウム、金、銀、スズ、銅、白金、パラジウム、炭素および半導体材料よりなる群から選択される材料からなる請求項18記載の電子デバイス。

22. さらに、該複数の電極の間に設けた電子的絶縁材よりなる請求項18記載の電子デバイス。

23. 該複数の電極がアレイ中に配置された請求項18記載の電子デバイス。

24. さらに、結合物質、試薬および分析物よりなる群から選択される物質よりなる溶液を保持するためのキャビティよりなる請求項18記載の電子デバイス。

25. 特異的結合物質が、該複数のアドレス可能な結合位置に選択的に輸送され、それに結合されて、アドレスされた能動的な位置デバイスを形成する請求項18記載の電子デバイス。

26. デバイス上の結合位置の幅が0.5  $\mu\text{m}$ および200  $\mu\text{m}$ の間である請求項18記載の電子デバイス。

27. デバイス上の結合位置の幅が5  $\mu\text{m}$ および100  $\mu\text{m}$ の間である請求項18記載の電子デバイス。

28. 該複数の結合位置が二次元アレイ中に配置されている請求項18記載の電子デバイス。

29. 該複数の結合位置が3次元アレイ中に配置されている請求項18記載の電子デバイス。

30. さらに、コンピューター・システムよりなり、ここに該システムが該複数の結合位置に電子的に連結されている請求項18記載の電子デバイス。

31. 該コンピューター・システムが該電極に連結されている請求項30記載の電子デバイス。

32. 電源に連結した位置を供し；

第1の核酸を第2の核酸と接触させ、ここに、該第2の核酸は該位置に付着され；次いで、

該位置を十分な時間、負の電位に置くことよりなり、ここに、もし該第1の核酸が該第2の核酸に対して非特異的核酸配列であれば該第1の核酸を第2の核酸から除去するが、もし該第1の核酸が該第2の核酸に対して特異的核酸配列であれば除去しない工程よりなることを特徴とする核酸ハイブリダイゼーションを電子工学的に制御する方法。

33. 該第1の核酸および該第2の核酸が溶液中に存在する請求項32記載の



方法。

34. さらに、該位置を負の電位に置く前に該位置を正の電位に置き、それにより該第1の核酸を該位置に濃縮する工程よりなる請求項32記載の方法。

35. 該負の電位を一定値ごとに上昇させるかまたは低下させる請求項32記載の方法。

36. 該非-特異的核酸配列が該第2の核酸の配列に対して1個の誤対合を有する請求項32記載の方法。

37. 該第1の核酸が7以下のヌクレオチドよりなる請求項32記載の方法。

38. 該第1の核酸が22以上のヌクレオチドよりなる請求項32記載の方法。

39. 該第1の核酸が7および22の間のヌクレオチドよりなる請求項32記載の方法。

40. 該第1の核酸が検出可能なエレメントよりなる請求項32記載の方法。

41. 該第1の核酸が発蛍光団よりなる請求項32記載の方法。

42. 該発蛍光団がテキサス・レッドおよびフルオレセインよりなる群から選択される請求項41記載の方法。

43. 該第1の核酸がデオキシリボヌクレオチドよりなる請求項32記載の方法。

44. 該第1の核酸がリボヌクレオチドよりなる請求項32記載の方法。

45. 該第1の核酸が修飾ヌクレオチドよりなる請求項32記載の方法。

46. さらに、該溶液中に検出可能な染料を添加し、ここに、該染料は一本鎖核酸よりも高い親和性でもって二本鎖核酸に結合し；次いで

該位置における該染料のレベルを検出することによって、該位置における、第1の核酸および該第2の核酸の間のハイブリダイゼーションのレベルを測定する工程よりなる請求項33記載の方法。

47. 該染料が臭化エチジウムよりなる請求項46記載の方法。

48. さらに、該溶液に検出可能な染料を添加し、ここに、該染料は一本鎖核酸よりも二本鎖核酸と接触した場合により強い検出可能なシグナルを発し；次い

で、

該位置における該染料の該検出可能なシグナルのレベルを測定することによって、該位置における、該第1の核酸および該第2の核酸の間のハイブリダイゼーションのレベルを測定する工程よりなる請求項33記載の方法。

49. 該染料が臭化エチジウムよりなる請求項48記載の方法。

50. 該溶液が、該第2の核酸に対して非特異的な核酸配列よりなる第3の核酸からなる請求項33記載の方法。

51. 該第3の核酸の濃度が該第1の核酸の濃度の1,000倍を超える請求項50記載の方法。

52. 該第1の核酸が7のヌクレオチドよりなる請求項32記載の方法。

53. 該第1の核酸が5および7の間のヌクレオチドよりなる請求項32記載の方法。

54. 該第1の核酸が2,2のヌクレオチドよりなる請求項32記載の方法。

55. 電源に連結した位置を供し；

複数の核酸を標的核酸と接触させ、ここに、該標的核酸は該位置に付着され；  
次いで、

該位置を十分な時間、負の電位に置くことよりなり、ここに、該複数の核酸配列からの、該標的核酸に対して特異的な核酸配列ではなく該標的核酸に対して非特異的な核酸配列を該標的核酸から除去する工程よりなることを特徴とする核酸ハイブリダイゼーションを電子工学的に制御する方法。

56. 溶液を、第1の下に存在する電極を含む第1の位置と、第2の下に存在する電極を含む第2の位置とを接触させ；次いで

該第1の位置を、該第2の位置に対して、電氣的荷電物質と反対の電荷に置き、それにより、該第2の位置ではなく該第1の位置に該荷電物質を濃縮する工程よりなる電氣的荷電物質を電子工学的に濃縮する方法。

57. さらに、該第2の位置を該物質に対して同一の電荷に置く工程よりなる請求項56記載の方法。

58. さらに、該第1の位置にて該物質および付着層の間に共有結合を形成さ

せる工程よりなる請求項56記載の方法。

59. 該物質が核酸であって、該第1の位置が正の電位で荷電されている請求項56記載の方法。

60. 該第2の位置が負の電位で荷電された請求項59記載の方法。

61. 該第1の位置における該物質の濃度が、該第2の位置における該物質のものの10倍を超える請求項56記載の方法。

62. 該第1の位置における該物質の濃度が、該第2の位置における該物質のものの1,000倍を超える請求項56記載の方法。

63. 該第1の位置における該物質の濃度が、該第2の位置における該物質のものの $10^6$ 倍を超える請求項56記載の方法。

64. さらに、該物質を該第1の位置に付着させる工程よりなる請求項56記載の方法。

65. 溶液を第1および第2の位置と接触させ；

該第1の位置を、該第2の位置に対して、電氣的荷電物質と反対の電荷に置き、それにより、該荷電物質を該第1の位置に輸送し；次いで、

しかる後、該第2の位置を、該第1の位置に対して、該荷電物質に対する反対の電荷に置き、それにより、核酸を該第1の位置から該第2の位置に輸送する工程よりなることを特徴とする第1の位置から第2の位置まで溶液中の荷電物質を電子工学的に輸送する方法。

66. 該物質が核酸である請求項65記載の方法。

67. さらに、該物質を該第2の位置に付着させる工程よりなる請求項65記載の方法。

68. 基板上に複数の反応位置を供し、ここに、各反応位置は個々に電子工学的にアドレス可能であり；

各反応位置上に付着層を形成し；

該複数の反応位置を荷電モノマーAよりなる溶液と接触させ；

反応AがモノマーAに対して反対の電荷で起こる指定したA位置を選択的に偏

倚させ、モノマーAと同一の電荷では反応Aが起こらないもう1つの位置を偏倚

させ、それにより、モノマー A を該 A 位置に濃縮し反応させ；

しかる後、未反応モノマー A を該複数の反応位置から除去し；

該複数の反応位置を荷電モノマー B よりなる溶液と接触させ；

モノマー B の反対の電荷における該 A 位置を選択的に偏倚させ、モノマー B と同一の電荷では反応 B が起こらないもう 1 つの位置を偏倚させ、それにより、該 A 位置にモノマー B を濃縮させ反応させてダイマー A-B を得る工程よりなることを特徴とする複数の位置で生体高分子を電子工学的に制御して合成する方法。

69. 該モノマー A がヌクレオチドよりなり、かつ該モノマー B がヌクレオチドよりなる請求項 68 記載の方法。

70. 該モノマー A がアミノ酸よりなり、かつ該モノマー B がアミノ酸よりなる請求項 68 記載の方法。

71. 特異的核酸配列に対して相補的な配列を供し、マスターデバイス上のアドレスされた該特異的核酸配列に該相補的配列をハイブリダイズさせ；

該マスターデバイス上のアドレスされた位置と共に受容体自己アドレス可能な電子デバイス上のアドレスされていない位置を配置させ；次いで、

負の該マスターデバイス上の位置および正の該受容体デバイス上の位置を偏倚させ、それにより、該相補的配列を該受容体デバイス上の該アドレスされていない位置まで輸送する工程よりなることを特徴とする特異的核酸配列でアドレスされたマスター自己アドレス可能な電子デバイスを複製する方法。

72. さらに、マスター鋳型からの相補的配列を変性できる正に荷電したカオトロピック剤または変性剤を供する工程よりなる請求項 71 記載のパターン化された配列を複製する方法。

73. 各々が電極よりなる複数の電子工学的にアドレス可能な位置；および該複数の位置の各々に付着した結合物質よりなり、

ここに、該結合物質の各々は遺伝子配列の存在を検出できることを特徴とする遺伝子タイプ分けのための自己アドレス可能な電子デバイス。

74. 該遺伝子配列がヌクレオチド配列である請求項 73 記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

75. 該ヌクレオチド配列がcDNA配列である請求項74記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

76. 該ヌクレオチド配列がゲノムDNA配列である請求項74記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

77. 該ヌクレオチド配列がmRNA配列である請求項74記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

78. 該ヌクレオチド配列がcRNA配列である請求項74記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

79. 該遺伝子配列がアミノ酸配列である請求項73記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

80. 各々の該複数の位置に結合する各々の該結合物質が同一である請求項73記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

81. 該結合物質がもう1つの該結合物質とは異なる請求項73記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

82. 各々が電極よりなる複数の電子工学的にアドレス可能な位置を供し；

結合物質を該複数の位置の各々に付着させ、ここに、該結合物質の各々は遺伝子配列の存在を検出でき；

試料を該複数の位置と接触させ；

該複数の位置の各々において遺伝子配列の不存在または存在を検出することによって該試料の遺伝子プロファイルを決定する工程よりなることを特徴とする電子工学的に制御された遺伝子をタイプ分けする方法。

83. 電極よりなる電子工学的にアドレス可能な位置を供し；

基質を該位置と接触させ；

該位置を酵素に対して反対の電荷に置き、それにより、該酵素を該位置に濃縮し；

該基質を該位置に付着させ；

該酵素を該位置と接触させ；

該位置を該酵素と反対の電荷に置き、それにより該酵素を該位置に濃縮し；

該酵素を該位置の該基質と反応させる工程よりなることを特徴とするアドレス可能な位置において電子工学的に制御された酵素反応を行う方法。

84. 該基質が核酸よりなる請求項83記載の方法。

85. 該酵素が制限酵素、リガーゼ、プロテイナーゼ、グリコシダーゼまたはホスホリラーゼよりなる請求項83記載の方法。

86. 該酵素がDNAポリメラーゼよりなる請求項83記載の方法。

87. 該酵素がRNAポリメラーゼよりなる請求項83記載の方法。

88. 該酵素反応が核酸の酵素消化よりなる請求項83記載の方法。

89. 該酵素反応が核酸の合成よりなる請求項83記載の方法。

90. 該酵素反応がポリペプチドの合成よりなる請求項83記載の方法。

91. (1) 電極よりなる電子工学的にアドレス可能な位置を供し；

(2) 該位置に付着したオリゴヌクレオチドプライマーYを供し；

(3) 一本鎖核酸Xを該位置と接触させ、ここに、該プライマーYは該核酸Xに特異的にハイブリダイズし；

(4) 該位置を該核酸Xに対して反対の電荷に置き、それにより、該位置に該核酸Xを濃縮し、該核酸Xを該プライマーYにハイブリダイズさせ；

(5) 核酸ポリメラーゼを該位置と接触させ；

(6) 該位置を該ポリメラーゼに対して反対の電荷に置き、それにより、該ポリメラーゼを該位置に濃縮し、該ポリメラーゼが該位置で該プライマーYから核酸Yを合成するのを可能とし；

(7) 該位置を十分な時間、負の電位に置いて、該核酸Xを該位置から除去し；

(8) オリゴヌクレオチドプライマーXを該位置と接触させ、ここに、該プライマーXは該核酸Yに特異的にハイブリダイズし；

(9) 該位置を該プライマーXに対して反対の電荷に置き、それにより、該プライマーXを該位置に濃縮し、該プライマーXを該核酸Yにハイブリダイズさせ；

(10) 該位置を該ポリメラーゼと反対の電荷に置き、それにより、該ポリメラーゼを該位置に濃縮し、それにより、該ポリメラーゼが該位置の該プライマー

Xから核酸を合成するのを可能とする工程よりなる核酸の電光学的に制御された増幅を行う方法。

92. 直流電流電場において荷電した第1のマクロ分子を第2のマクロ分子と接触させ、ここに、該第2のマクロ分子は位置に結合され；

該位置を十分な時間、該第1のマクロ分子の電荷に対して反対の電位に置き、ここに、該第1のマクロ分子はもし該第1のマクロ分子が該第2のマクロ分子に特異的に結合しなければ該第2の分子から除去されるが、もし該第1のマクロ分子が該第2のマクロ分子に特異的に結合すれば除去されない工程よりなることを特徴とするマクロ分子間で電子工学的に制御された結合を行う方法。

93. 該第1のマクロ分子がポリペプチドである請求項92記載の方法。

94. 該第1のマクロ分子が核酸である請求項92記載の方法。

**【発明の詳細な説明】**

分子生物学的分析用および診断用の自己アドレス可能な自己組立て超小型電子システムおよびデバイス

**発明の分野**

本発明は、顕微鏡形式において複数工程かつ複合した反応を能動的に行うことができる自己アドレス可能な自己組立て超小型電子システムの設計、製造および使用に関する。特に、これらの反応には、核酸ハイブリダイゼーション、核酸増幅、試料調製、抗体／抗原反応、臨床的診断、および生体高分子合成のごとき分子生物学的反応が含まれる。

**発明の背景**

分子生物学は核酸および蛋白質の分析のための広範囲の技術よりなり、そのうちの多くは、臨床的診断アッセイの基礎を形成する。これらの技術には、核酸ハイブリダイゼーション分析、制限酵素分析、遺伝子配列分析、ならびに核酸および蛋白質の分離および精製が含まれる(例えば、ジェイ・サンプルック(J. Sambrook)、イー・エフ・フリッシュ(E. F. Fritsch)およびティー・マニアティス(T. Maniatis)、「モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」第2版、ニューヨーク州、コールド・スプリング・ハーバー(Cold Spring Harbor, New York)のコールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)社、1989年)。

多くの分子生物学的技術には、非常に多くの試料につき膨大な数の操作を行うことが含まれている。それらは、しばしば、複雑で時間がかかり、一般に高い精度が要求される。多くの技術は、感度、特異性または再現性の欠如によってその適用が制限されている。例えば、感度および特異性に伴う問題は、これまで、核酸ハイブリダイゼーションの実際的な適用を制限してきた。

核酸ハイブリダイゼーション分析には、一般的に、大量の非標的核酸の中から非常に少数の特異的標的核酸(DNAまたはRNA)をプローブで検出することが含まれる。高い特異性を維持するためには、通常は、温度、塩、洗剤、溶媒、



カオトロピック剤および変性剤の種々の組合せにより達成される最も厳格な条件下でハイブリダイゼーションを行う。

複数試料の核酸ハイブリダイゼーション分析は、種々のフィルターおよび固体支持体の形式で行われてきた(ジイ・エイ・ベルツ(G. A. Beltz)ら、メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology)第100巻 B部、アー・ルー・ウー(R. Wu)、エル・グロスマン(L. Grossman)、ケイ・モルダブ(K. Moldave)編、ニューヨーク(New York)、アカデミック・プレス(Academic Press)社、第19章、266-308頁、1985年)。1つの形式、いわゆる「ドットブロット」ハイブリダイゼーションには、フィルターへ標的DNAを非共有結合させ、引き続いてこれをラジオアイソトープで標識したプローブ(群)とハイブリダイズさせることが含まれる。「ドットブロット」ハイブリダイゼーションは広範囲の用途を獲得しており、多くのバージョンが開発された(エム・エル・エム・アンダーソン(M. L. M. Anderson)およびビー・ディー・ヤング(B. D. Young)、「核酸ハイブリダイゼーション-実践的アプローチ(Nucleic Acid Hybridization-A Practical Approach)」ビー・ディー・ハーメス(B. D. Hammes)およびエス・ジェイ・ヒギンズ(S. J. Higgins)編、ワシントンDC(Washington D. C.)、アイアールエル・プレス(I R L Press)社、第4章、73-111頁、1985年参照)。「ドットブロット」ハイブリダイゼーションは、さらに、ゲノム突然変異の多重分析用(ディー・ナニブシャン(D. Nanibhushan)およびディー・ラビン(D. Rabin)、1987年7月8日、欧州特許出願第0228075号)ならびに重複クローンの検出用およびゲノム地図作製用(ジイ・エイ・エバンス(G. A. Evans)、1993年6月15日、米国特許第5,219,726号)にも開発されている。

もう1つの形式、いわゆる「サンドイッチ」ハイブリダイゼーションには、固体支持体にオリゴヌクレオチド・プローブを共有結合させ、次いでそれを用いて

複数の核酸標的を捕捉し検出することが含まれる(エム・ランキ(M. Ranki)ら、ジーン(Gene)第21巻、77-85頁、1983年；エイ・エム・パルバ(A. M. Palva)、ティー・エム・ランキ(T. M. Ranki)およびエイチ・イー・ソーダー

lund(H. E. Soderlund)、1985年10月2日、英国特許出願GB 2 156 074 A号；ティー・エム・ランキ(T. M. Ranki)およびエイチ・イー・ソーダールlund(H. E. Soderlund)、1986年1月7日、米国特許第4,563,419号；エイ・ディー・ビー・マルコム(A. D. B. Malcolm)およびジェイ・エイ・ランデール(J. A. Langdale)、1986年7月3日、PCT WO 86/03782；ワイ・スタビンスキー(Y. Stabinsky)、1988年1月14日、米国特許第4,751,177号；ティー・エイチ・アダムス(T. H. Adams)ら、1990年2月22日、PCT WO 90/01564；アール・ビー・ワラス(R. B. Wallace)ら、ヌクレイック・アシズ・リサーチ(Nucleic Acids Res.)第11巻、3543頁、1979年；およびビー・ジェイ・コナー(B. J. Connor)ら、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・イン・ユウエスエイ(Proc. Natl. Acad. Sci. U S A)第80巻、278-282頁、1983年)。これらの形式の複合バージョンは「リバーズ・ドット・ブロット(reverse dot blot)」と呼称されている。

最近の核酸ハイブリダイゼーション形式および厳格な制御方法を用い、最も高感度のレポーター基(酵素、蛍光発色団、ラジオアイソトープ等)および結合検出系(フルオロメーター、ルミノメーター、フォトン・カウンター、シンチレーション・カウンター等)を用いる場合でさえ、低コピー数(すなわち、1-100,000個)の核酸標的を検出することは依然困難である。

この困難さは、直接的プローブ・ハイブリダイゼーションに関連して生じる幾つかの問題によって引き起こされる。1つの問題は、ハイブリダイゼーション反応の厳格な制御に関連している。ハイブリダイゼーション反応は、ハイブリダイゼーションの特異性を達成するために、通常、厳格な条件下で行われる。厳格な制御の方法には、第一義的には、ハイブリダイゼーションにおける温度、イオン強度および変性剤の最適化、および続く洗浄法が含まれる。残念なことには、こ

これらの厳格な条件を適用すると、検出するためのハイブリダイズ・プローブ/標的複合体の数の顕著な減少が起こる。

もう1つの問題は、大部分の試料、特にヒトゲノムDNA試料中のDNAが非

常に複雑なことに関連する。試料が、特異的標的配列に酷似した膨大な数の配列よりなる場合には、最もユニークなプローブ配列でさえ、非-標的配列と多数の部分的ハイブリダイゼーションを起こす。

第3の問題は、プローブとその特異的標的との間の好ましくないハイブリダイゼーション動力学に関連する。最良の条件下でさえ、大部分のハイブリダイゼーション反応は、相対的に低濃度のプローブおよび標的分子で行われる。加えて、プローブはしばしば標的核酸に対する相補鎖と競合する。

現在の大部分のハイブリダイゼーション形式に関する第4の問題は、高レベルの非-特異的バックグラウンド・シグナルである。これは、ほとんどいずれの物質にもDNAプローブが親和性を有することによって引き起こされる。

これらの問題が個々に、または組み合わせさせて、前記形式の核酸ハイブリダイゼーションの感度および/または特異性を喪失させる。大部分の核酸を基礎とする臨床的診断アッセイには低コピー数の核酸標的を検出することが必要であるため、このことは残念である。

低コピー数の核酸標的を検出することが困難なために、研究コミュニティは標的核酸配列を増幅させるためのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に大きく依存している(エム・エイ・イニス(M. A. Innis)ら、「PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications」、アカデミック・プレス(Academic Press)社、1990年)。たとえ、どんなに長期を要し厄介な工程であっても、PCR反応によって作製した膨大な数の標的核酸配列によって、続いての直接的核酸プローブ技術が改善される。

直接的プローブで低コピー数の標的核酸を検出することの一般的な困難さに対する特徴的な例外は、イン・サイチュ・ハイブリダイゼーション技術である。この技術によって、低コピー数のユニークな核酸配列を個々の細胞で検出することができる。イン・サイチュ形式においては、比較的高い局所濃度で細胞( $\sim 20$ -

$50 \mu\text{m}^2$ )または核( $\sim 10 \mu\text{m}^2$ )の領域に標的配列が自然に制限される。さらに、プローブ/標的ハイブリダイゼーション・シグナルは、顕微鏡的および形態学的に異なった領域に制限され；このことによって、固体支持体上におけるハイ

ブリダイゼーションよりも、人工的または非特異的シグナルから陽性シグナルを容易に区別することができる。

ある種の態様でイン・サイチュ・ハイブリダイゼーションを模倣することによって、超微細形式化した複合装置またはマトリックス装置(例えば、DNAチップ)にて多重試料核酸ハイブリダイゼーション分析を行う新しい技術が開発されている(エム・バリナガ(M. Barinaga)、サイエンス(Science)第253巻、1489頁、1991年；ダブリュ・ベインズ(W. Bains)、バイオ／テクノロジー(Bio/Technology)第10巻、757-758頁、1992年参照)。これらの方法は、通常、DNAチップの超微細ウェルのごとき固体支持体の非常に小さな特異的領域に特異的DNA配列を結合させる。これらのハイブリダイゼーション形式は、従来の「リバース・ドット・プロット」および「サンドイッチ」ハイブリダイゼーション系の超微細スケールのバージョンである。

超微細形式化ハイブリダイゼーションを用いれば、「ハイブリダイゼーションによる配列決定」(SBH)(エム・バリナガ(M. Barinaga)、サイエンス(Science)第253巻、1489頁、1991年；ダブリュ・ベインズ(W. Bains)、バイオ／テクノロジー(Bio/Technology)第10巻、757-758頁、1992年参照)を行うことができる。SBHは、全ての可能なn-ヌクレオチド・オリゴマー(n重体)を使用して、未知のDNA試料中のn重体を同定することができ、続いてそれをアルゴリズム分析によって並べて、DNA配列を作製する(アール・ドーマナック(R. Drmanac)およびアール・クルクベンジャコフ(R. Crkvenjakov)、ユーゴスラビア国特許出願#570/87、1987年；アール・ドーマナック(R. Drmanac)ら、ゲノミクス(Genomics)第4巻、114頁、1989年；ステレゾスカ(Strezoska)ら、プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・イン・ユウエスエイ(Proc. Natl. Acad. Sci. U S A)第88巻、10089頁、1991年；およびアール・ドーマナック(R. Drman

ac)およびアール・ビー・クルクベンジャコフ(R. B. Crkvenjakov)米国特許第5,202,231号、1993年4月13日)。

S B Hを行うには2つの様式がある。1つの形式には、支持体上に全ての可能なn重体アレイを作製し、次いで、これを標的配列とハイブリダイズさせることが含まれる。これは、リバーズ・ドット・プロットのバージョンである。もう1つの形式には、標的配列を支持体に結合させ、これを全ての可能なn重体で順次釣り上げることが含まれる。両形式とも、直接的プローブ・ハイブリダイゼーションの基本問題および複合ハイブリダイゼーションに関するさらなる困難性を有している。

サザン(Southern)、英国特許出願GB 8810400号、1988年；イー・エム・サザン(E.M. Southern)ら、ゲノミクス(Genomics)第13巻、1008頁、1992年では、DNAを分析しまたはDNAを配列決定するのに「リバーズ・ドット・プロット」形式を使用することが提案されている。サザン(Southern)は、PCR増幅させたゲノムDNAを用いて既知の単一点突然変異を同定した。また、サザンは、S H B用の固体支持体上にオリゴヌクレオチドのアレイを合成する方法も記載している。しかしながら、サザンは、アレイ上の各オリゴヌクレオチドに対して、最適な厳格な条件をどのようにして達成するかについては触れていない。

フォードール(Fodor)ら、ネイチャー(Nature)第364巻、555-556頁、1993年では、固体支持体上の1,024の8重体のオリゴヌクレオチドのアレイを用いてDNA配列を決定している。この場合において、標的DNAは、AおよびC塩基のみを含有する蛍光標識した一本鎖の12重体オリゴヌクレオチドであった。アレイ上の8重体オリゴマーとのハイブリダイゼーションには、1 p m o l 濃度( $\sim 6 \times 10^{11}$  分子)の12重体標的配列が必要であった。この結果は多くの誤対合を示した。サザンと同様に、フォードール(Fodor)らも、複合ハイブリダイゼーションについての厳格な制御のごとき、直接的プローブ・ハイブリダイゼーションの基本的な問題には触れていなかった。これらの問題は、大量の単純12重体標的の必要性和合わさって、このS H B形式がかなり制限されることを示している。

最近、ドーマナック(Drmanac)ら、サイエンス(Science)第260巻、164

9-1652頁、1993年は、前記した第2形式を用いて幾つかの短かい(116bp)DNA配列を配列決定した。標的DNAは膜支持体に結合させた(「ドット・プロット」形式)。各フィルターを272の標識した10重体および11重体オリゴヌクレオチドと順次ハイブリダイズさせた。広範な厳格条件を用いて、各n重体プローブの特異的ハイブリダイゼーションが達成された；洗浄時間は5分間～一晩、温度は0℃～16℃で変化させた。大部分のプローブは、16℃にて3時間洗浄することが必要であった。ハイブリダイゼーション・シグナルを検出するため、フィルターは2～18時間感光させる必要があった。標的配列が単純であり、オリゴマーの設定を減少させ、かつ利用できる最も厳格な条件を用いたにも拘わらず、総じての偽陽性ハイブリダイゼーション率は5%であった。

フォードール(Fodor)ら、サイエンス(Science)第251巻、767-773頁、1991年は、写真平板技術を用いてマトリックス上にオリゴヌクレオチドを合成した。ピルング(Pirrung)ら、米国特許第5,143,854号、1992年9月1日は、シリコン基板上のアレイ様式にてのポリペプチドの大規模写真平板固相合成法を教示している。

マトリックス・ハイブリダイゼーションのもう1つのアプローチにおいて、ビーティエ(Beattie)ら、「1992年サンジエゴ会議：遺伝子認識(The 1992 San Diego Conference: Genetic Recognition)」1992年11月では、超微細ロボット工学システムを用いて、特異的DNA配列を含有する微小液滴をガラス基体上の個々の超微細加工試料ウェルに滴下させた。各試料ウェルにおけるハイブリダイゼーションは、交流(AC)電場で各個別超微小ウェルを取り囲んだ、ミニチュア電極試験固定体を応答指令信号を送ることによって検出する。

形式に拘わらず、全ての現行の超微細スケールのDNAハイブリダイゼーションおよびSHBのアプローチは、核酸ハイブリダイゼーション反応に関連する基本的な問題を克服していない。それらは、非常に高レベルの比較的短い一本鎖標的配列またはPCR増幅DNAを必要とし、最も厳格な条件下でさえ高レベルの

偽陽性ハイブリダイゼーション・シグナルを生じる。短かいオリゴヌクレオチド配列のアレイを用いた複合形式の場合においては、いずれの従来アプローチを用

いても各個別の配列につき厳格な条件を最適化することはできない。何故ならば、これらの形式に用いるアレイまたはデバイスでは、他の位置に比して個別の位置で温度、イオン強度または変性剤を変化させまたは調整できないからである。従って、共通の厳格な条件をデバイス上の全ての配列に用いなければならない。このことによって、多数の非-特異的および部分的ハイブリダイゼーションが生じ、デバイスの適用が非常に限定される。アレイ上の異なる配列の数が増加し、配列長が10重体以下まで減少するか、20重体以上まで増加するに従い、問題はより複雑となる。このことは、多数の短鎖オリゴヌクレオチド・プローブを必要とするSBHについては特に厄介である。

異なったサイズ、電荷または立体構造の核酸は、電場におけるそれらの異なった移動度によりハイブリダイゼーション種を区別できる電気泳動技術によって、日常業務的に分離される。パルスフィールド電気泳動は、媒質(例えば、ゲル)の周りの複数の電極配列を用いて、従来のゲル電気泳動系によっては分離できない非常に大きなDNA断片を分離する(アール・アナンド(R. Anand)およびイー・エム・サザン(E. M. Southern)、「核酸のゲル電気泳動-実践的アプローチ(Gel Electrophoresis of Nucleic Acids-A Practical Approach)」第2版、ディー・リックウッド(D. Rickwood)およびビー・ディー・ハーメス(B. D. Hames)編、ニューヨーク(New York)のアイアールエル・プレス(IRL Press)社、101-122頁、1990年参照)。

ペース(Pace)、米国特許第4,908,112号、1990年3月13日は、超微細加工技術を用いてシリコン基板上にキャピラリー・ゲル電気泳動系を作製することを記載している。複数電極は、該系に組み込まれていて、該デバイス内の分離媒質を通して分子を移動させる。

ソアネ(Soane)およびソアネ(Soane)、米国特許第5,126,022号、1992年6月30日は、多数の電極を用いれば、管中に含まれるゲル分離媒質を通して混合物中の荷電分子の線形移動を制御することができることを記載している。

分離媒質中の分子の移動および位置を制御するには、電極を管内に設置しなけれ

ばならない。

ワシズ,エム(Washizu, M.)およびクロサワ,オウ(Kurosawa, O.)アイイーイー・トランザクションズ・オン・インダストリー・アプリケーションズ(I E E E Transactions on Industry Applications)第6巻、1165-1172頁、1990年は、高周波数交流(A C)電場を用いて、超微細加工電極間に生じる電場列(line)の方向にDNAを向けた。しかしながら、直流(D C)電界をそれらの研究に使用することはできない。ワシズ(Washizu)、ジャーナル・オブ・エレクトロスタティクス(J . E lectrostatics)第25巻、109-123頁、1990年には、二重電気泳動(dielectrophoresis)を用いた細胞および生物分子の操作が記載されている。細胞を融合でき、超微細-電極構造間のA C 電圧によって生じた電場列に沿って生物分子を方向付けることができる。しかしながら、二電気泳動工程には、非常に高周波数のA C (1 M H z)電圧と低導電率の媒質とが必要である。これらの技術は、A C 電場列に沿って異なったサイズのDNA分子を方向付けることができるが、それは同じサイズのハイブリダイゼーション複合体同志を区別することができない。

前記より明らかなごとく、複数工程かつ複合の分子生物学的反応を行う有効な技術を提供するために、膨大な試行がなされてきた。しかしながら、前記の理由によって、これらの技術は不十分であることが証明された。有効な技術に対する要望が長い間認識されてきたにも拘わらず、今まで満足のいく解法は提唱されていない。

#### 発明の概要

本発明は、顕微鏡形式において制御された複数工程かつ複合の反応を能動的に行うことができる、プログラム可能で、自己アドレス可能な自己組立て超微細電子システムおよびデバイスの設計、製造および使用に関する。これらの反応には、限定するものではないが、核酸ハイブリダイゼーション、抗体／抗原反応、および関連する臨床的診断のごとき大部分の分子生物学的反応が含まれる。加えて、

特許請求するデバイスは、多工程の組み合わせ生体高分子合成も行うことができ



、それらには、限定するものではないが、特異的超微小位置での異なったオリゴヌクレオチドまたはペプチドの合成が含まれる。

特許請求するデバイスは、超微細リソグラフィーおよび超微細加工技術の両方を用いて製造する。該デバイスはアドレス可能な顕微鏡位置のマトリックスをその表面に有しており；各個別の超微細位置は、特異的に結合する物質(例えば、核酸、抗体)のそれ自体への輸送および結合を電子工学的に制御し指定できる。全ての超微細位置は、それらの特異的結合物質に関してアドレス可能である。これらのデバイスを用いれば、該システムは最小限の外部介入にて自己組立て可能である。

該アドレス・デバイスは、種々のアッセイおよび反応を制御することができ、かつ能動的に行うことができる。分析物または反応物は、自由フィールド電気泳動によっていずれかの特異的超微細-位置まで輸送でき、そこでその分析物または反応物は効率的に濃縮され、特異的結合物質と反応する。特異的な分析物または反応物を検出する感度は、濃縮効果のために改善される。いずれの非-結合分析物または反応物も、超微細-位置の極性を逆転させることによって除去することができる。かくして、当該デバイスはアッセイおよび反応の特異性も改善する。

該デバイスの能動的な特性によって、各特異的超微細-位置で生じるハイブリダイゼーション反応(またはいずれかの他の親和性反応)の全ての態様にわたる独立した電子工学的制御が供される。これらのデバイスによって、電子工学的厳格制御(E S C)と呼称されるハイブリダイゼーション反応に影響する新たな機構が提供される。異なった厳格条件を要するDNAハイブリダイゼーション反応については、E S Cによって従来のアレイ技術の本来有する限界が克服される。本発明の能動的デバイスは、各超微細-位置で「異なった厳格条件」を電子工学的に作り出すことができる。かくして、全てのハイブリダイゼーションは、同一のバルク溶液中で最適に行うことができる。これらの能動的デバイスは、従来の複合ハイブリダイゼーション・アレイおよびDNAチップとは基本的に異なる。従来の

のアレイは、各部位に位置する異なったプローブまたは標的DNAを有するにも

拘わらず；アレイ上の全部位は温度、緩衝液、塩濃度およびpHの共通した反応もしくは厳格条件を有している。反応もしくは厳格条件におけるいずれの変化も、該アレイ上の全部位に影響する。複雑化した写真平板技術を用いてアレイを作製し、あるいは超小型電子検知素子を検出用に組み込むことができるが、従来のデバイスは受動的であり、かつ現実のハイブリダイゼーション工程を制御しまたは影響を与えない。本発明の能動的なデバイスは、各超微細-位置を完全に独立した試験もしくは分析部位として機能させる（すなわち、それらは各位置において同等の「試験管」を形成する）。複合的ハイブリダイゼーション反応が、最少の外部物理学的操作で行うことができる。加えて、緩衝液を交換するために温度を変化させる必要がなく、複数回洗浄する工程の必要性がなくなる。

かくして、特許請求するデバイスでは、多工程かつ複合した反応を完全かつ正確な電子工学的制御で、好ましくは全体マイクロプロセッサ制御で行う（すなわち、コンピューターによって行う）ことができる。多工程かつ複合した反応の速度、特異性および感度は、特許請求するデバイス上の各特異的超微細-位置で顕著に改善されている。

また、デバイスは、組み合わせた光学的（蛍光、化学ルミネッセンス、または分光光度測定）なイメージング検出系を用いることによって、各超微細-位置でハイブリダイズした複合体を容易に検出できる。直接的にDNAを検出する集積オプトエレクトロニクスまたは電子工学的センシング素子も、そのデバイス本体に組み込むことができる。

所望により、特異的結合性物質でアドレスされたマスターデバイスは、もう1つの基盤デバイスに電子工学的に複製またはコピーできる。

本発明は、本発明の目的と一致するいずれのサイズまたは形態の超微細-位置にも利用することができる。本発明の好ましい具体例において、サブ-ミリメートル範囲の超微細-位置を用いる。

「特異的結合物質」とは、一般的に、共有結合または非共有結合を介して他の分子、高分子または細胞に対して特異的な親和性を有する生物学的分子または合

成分子を意味する。好ましくは、特異的結合物質には、それを超微細-位置表面

の共通官能基に共有結合または非共有結合させ得る(自然にまたは修飾による)官能化学基(第一級アミン、スルヒドリル、アルデヒド等)、共通配列(核酸)、エピトープ(抗体)、ハプテンまたはリガンドが含まれる。特異的結合物質には、限定するものではないが：デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、合成オリゴヌクレオチド、抗体、蛋白質、ペプチド、レクチン、修飾多糖、細胞、合成複合高分子、機能性ナノ構造物、合成ポリマー、修飾/ブロックしたヌクレオチド/ヌクレオシド、修飾/ブロックしたアミノ酸、蛍光発色団、発色団、リガンド、キレートおよびハプテンが含まれる。

「厳格な制御」とは、幾つかの物理学的パラメーターを変化させることによって、特異的および非特異的な結合相互作用を区別できる能力を意味する。核酸ハイブリダイゼーションの場合、温度制御を厳格性にしばしば用いる。反応は、特定の二本鎖ハイブリッド対の融点( $T_m$ )またはその付近で行う。

かくして、本発明の第一かつ最も重要な態様は、電子工学的にプログラム可能で自己アドレス指定可能な顕微鏡位置のアレイを有するデバイスである。各顕微鏡位置には、基板によって支持される下部作動性直流(DC)超微細-電極が含まれる。各超微細-位置の表面は、小さな対イオンが自由に輸送される浸透層、および特異的結合物質が共有カップリングする付着層を有する。これらのユニークな設計特徴は、該デバイスに以下の重要な特性を提供する：(1)制御可能な機能性DC電極を超微細位置の下側に維持できること；(2)電気泳動的輸送を維持できること；および(3)電極(金属)インターフェースで起こる電気化学反応および逆電解反応から親和性反応または結合反応を分離すること。これらのデバイスに用いられる超微細-電極の主機能が、結合物質および反応物質を特異的位置に向ける電気泳動的推進力を供することである。

「アレイ」または「マトリックス」とは、デバイス上のアドレス指定可能な位置の配列を意味する。該位置は、二次元アレイ、三次元アレイ、または他のマトリックス形式で配置することができる。位置の数は、数個から少なくとも数十万までの範囲とすることができる。各位置は、全体的に独立した反応部位を表している。

第2の態様において、本発明は、結合物質をデバイス上のいずれかの特異的超微細-位置に輸送する方法をその要旨とする。活性化されれば、超微細-位置は、いずれの荷電した機能性特異的結合物体のそれ自体までの自由フィールド電気泳動的輸送にも影響を及ぼすことができる。特異的超微細-位置と接触すると、機能化された特異的結合物質が直ちにその特異的超微細-位置の付着層表面に共有結合する。他の超微細-位置も、荷電分子に対して反対の電位にそれらを維持することによって、同時に保護することができる。該工程は、全超微細-位置がそれらの特異的結合性物質でアドレスされるまで、迅速に繰り返すことができる。

「荷電機能化特異的結合物質」とは、化学反応性(すなわち、位置に共有結合できる)であって、正味荷電(+または-のいずれか)に帯電していることを意味する。

第3の態様において、本発明はデバイス上のいずれかの特異的超微細-位置で分析物または反応物を濃縮させ、反応させる方法をその要旨とする。特異的結合物質が付着した後も、各超微細-位置の下部超微細電極は直流(DC)モードで機能し続ける。このユニークな特徴によって、溶液中に遊離した比較的希薄な荷電分析物または反応物分子を、該分析物または該反応分子に対して反対の電荷に維持されているいずれの特異的超微細-位置でも順次または平行様式で、迅速に輸送し、濃縮し、反応させることができる。特異的超微細-位置は、分析物または反応物分子と同じ電荷でそれを維持することによって保護または遮断することができる。選択した超微細-位置で希薄な分析物または反応分子を濃縮するこの能力によって、これら超微細-位置における反応速度を顕著に加速することができる。

所望の反応が完了したら、超微細-電極の電位を逆転させて、該超微細-位置から非特異的分析物または未反応分子を除去することができる。

特異的分析物または反応生成物は、いずれの超微細-位置からも放出し、さらなる分析のために他の位置に輸送することができ；あるいは、他のアドレス可能

な位置に保存でき；あるいは、該システムから完全に除去することができる。

特異的超微細-位置における分析物の続く分析も、これらの位置から非特異的

物質を反発させる能力によって、顕著に改善される。

第4の態様において、本発明は：

- ハイブリダイゼーションが起こる特異的超微細-位置(群)で、希薄標的DNAおよび/またはプローブDNA配列を迅速に濃縮し；

- ハイブリダイゼーションが起こった特異的超微細-位置(群)から、非-特異的に結合した標的DNA配列を迅速に除去し；

- ハイブリダイゼーションが起こった特異的超微細-位置(群)から、競合性の相補的標的DNAを迅速に除去し；

- 電子的厳格制御(ESC)を調整して、部分的にハイブリダイズしたDNA配列(1塩基を超える誤対合)を除去し；

- ESCを調整して、8重体～21重体の範囲のプローブを用いた単一誤対合ハイブリダイゼーションの解析能を改善し(例えば、それにより点突然変異を同定する)；

- ESCを用いて、従来の方法で用いていた範囲外のオリゴヌクレオチド点突然変異プローブ(例えば、21重体より長いプローブおよび8重体より短いプローブ)を効率的にハイブリダイズさせ；

- 同一バルク溶液中、同一温度で起こる個々のハイブリダイゼーション事象に独立したESCを適用し；次いで

- ESCを用いて、捕捉オリゴヌクレオチド・プローブのアレイに非増幅標的DNA配列がハイブリダイズするのを改善する

工程よりなる、核酸ハイブリダイゼーション反応の厳格制御を改善する方法をその要旨とする。

第5の態様において、本発明は、超微細-位置において生体高分子を組合せ合成する方法をその要旨とする。

第6の態様において、本発明は、マスターデバイスを複製する方法をその要旨とする。

第7の態様において、本発明は、試料の調製およびそのデバイスの分析構成要素までの輸送を電子工学的に行うデバイスをその要旨とする。

第8の態様において、本発明は、最小限の流体力学しか用いずに試薬および反応物を電子工学的にデリバリーするデバイスをその要旨とする。

第9の態様において、本発明は、分子生物学的反応およびDNA増幅反応(例えば、制限切断反応；およびDNA/RNAポリメラーゼおよびDNAリガーゼ標的増幅反応)を行うデバイスをその要旨とする。

第10の態様において、本発明は、制限断片を電子工学的にサイズ決定し、同定できる(例えば、電子工学的な制限断片長多型分析およびDNA指紋分析)デバイスをその要旨とする。

第11の態様において、本発明は、抗体-抗原および免疫診断反応を行うデバイスをその要旨とする。

第12の態様において、本発明は、オリゴヌクレオチドおよびペプチドの組合せ合成を行うことができるデバイスをその要旨とする。

第13の態様において、本発明は、選択的に細胞に結合し、細胞をハイブリダイゼーション用に加工し、細胞からDNAを取り出し、または細胞内でイン-サイチュ・ハイブリダイゼーションを行うデバイスをその要旨とする。

第14の態様において、本発明は、関連する光学的、オプトエレクトロニクスのまたは電子工学的な検出システムを有する自己-アドレス指定された超小型電子技術デバイス、または統合された光学的、オプトエレクトロニクスのまたは電子工学的な検出システムを有する自己-アドレス指定された超小型電子技術デバイスを用いて、アドレス指定された超微細-位置で起こる反応を検出し分析する方法をその要旨とする。

本発明のデバイスは能動的にプログラム可能な電子工学的マトリックス(active programmable electronic matrices)であるため、頭字語「APEX」を用いてこれらのデバイスのユニークな性質を記載または示す。APEX頭字語は、マイクロリソグラフィーにより作製した「チップ」および超微細加工デバイスの双方に用いる。

APEX超小型電子技術デバイスおよびチップの能動的な性質によって、広範な種々の分子生物学的反応を行う新たな機構を創出することができる。これらに

は、標的DNA分子およびRNA分子の線形および指数関数的な増加または増幅の両方を達成する新規な方法が含まれている。

該デバイスは：(1)室温(例えば、その $T_m$ よりかなり下)の共通緩衝液中でDNAハイブリッドを選択的に変性し；(2)2またはそれを超える超微細-位置の間でDNAを迅速に往ったり来たりして輸送または移動させ；および(3)所望の超微細-位置で特異的反応物、試薬および酵素を選択的に濃縮させることができる電子工学的メカニズムを提供する。これら全てには、分子生物学的および標的増幅型反応を行う新たな物理学的指標が含まれている。

多数の電子工学的に制御された分子生物学的反応の例が開発され、これらには：(1)特異的ds-DNA配列の電子工学的指向制限酵素切断；(2)電子工学的制限断片分析；(3)DNAポリメラーゼによる標的DNAの電子工学的増加；(4)DNAおよびRNAリガーゼによる標的DNA配列の電子工学的連結および増加；および(5)RNAポリメラーゼによる標的DNAの電子工学的増加が含まれる。これらの例は、APEXデバイス上で行うことができる分子生物学的反応および方法の代表的な型である。

本発明の他の要旨および利点は以下の発明の詳細な説明および請求の範囲から明らかであろう。

#### 図面の簡単な説明

図1はマイクロリソグラフィー技術を用いて作製した3つの自己アドレス指定可能な超微細-位置の断面図である。

図2はマイクロリソグラフィ的に作製した超微細-位置の断面図である。

図3は実際に作製し、オリゴヌクレオチドでアドレス指定し、試験した自己アドレス指定可能な64の超微細-位置チップの模式図である。

図4は特異的なオリゴヌクレオチドを超微細-位置の付着表面に迅速に共有結合させる特定の付着化学過程を示している。

図5は超微細-機械加工した96の超微細-位置デバイスの引き延ばしたダイアグラムである。

図6は超微細-機械加工したデバイスの断面図である。

図7は特定の超微細-位置で分析物または反応分子を電子工学的に濃縮するのに使用するデバイスの機構を示している。

図8は3つの特異的オリゴヌクレオチド結合物質(SSO-A、SSO-BおよびSSO-C)を有するデバイスの自己指定された組立てを示している。

図9は特異的DNA捕捉配列を含有する超微細-位置で濃縮される試料/標的DNAの電子工学的に制御されたハイブリダイゼーション工程を示している。

図10は電子工学的に指定された逐次ハイブリダイゼーション工程を示している。

図11は単一の点突然変異を決定するハイブリダイゼーション工程の電子工学的な厳格制御(ESC)を示している。

図12は標識DNAプローブを用いることなく、すなわち電子工学的に制御された蛍光染料検出プロセスによって、ハイブリダイズしたDNAを検出するスキームを示している。

図13はデバイスの電子工学的に制御された複製のスキームを示している。

図14はオリゴヌクレオチドの電子工学的に指向された組合せ合成のスキームを示している。

図15は電子工学的な厳格制御および従来技術を用いて行った15重体Ras12点突然変異ハイブリダイゼーションの結果を比較するグラフを示す。

図16はDNAの電子工学的に制御制限断片切断のスキームを示している。

図17はDNAポリメラーゼを用いたDNAの電子工学的に制御された増幅のスキームを示している。

図18は試料調製およびDNA分析を行うよう設計したAPEXデバイスのダイアグラムを示している。

#### 発明の詳細な説明

本発明のデバイスおよび関連する方法論によって、分子生物学的反応および診断反応を「完全な電子制御」下に行うことができる。本発明にいう「電子工学的制御」の意味は、該語の従来の本来的な意味を越えている。ほとんどの慣用的な超微細電子工学的デバイス、機器および検出システムは、電子工学的制御下で常



にあるレベルである。本発明の超小型電子技術デバイスは、慣用的な電子工学的制御のみならず、さらに重要なことには、それらが分子生物学的反応および診断反応を行う物理学的態様の直接的電子工学的制御をさらに提供する。本発明の基本的概念は、プログラム可能であってアドレス指定可能な顕微鏡位置を有する超小型電子技術デバイスである。各超微細-位置は、特異的結合物質が共有結合する誘導化された上面(すなわち、付着層)、中間浸透層、および下部直流(DC)超微細電極を有している。基本超小型電子技術構造を最初に作製した後、該デバイスは特異的結合性物質で各特異的超微細-位置のアドレッシングを自己指定することができる。この意味において、該デバイスはそれ自体を自己組立てする。自己アドレスされたデバイスは、続いていずれかのその超微細-位置で個々の複数工程で組合せ反応を能動的に行うことができる。デバイスは、複合の反応を行うことができるが、重要な利点は各反応が真に独立した試験部位で同等に起こることである。デバイスは、そのいずれの超微細-位置への、またはそこからの分析物および反応物の迅速な移動および濃縮を、電子工学的に指定し制御することができる。種々の反応の動的態様を電子工学的に制御するデバイスの能力によって、多数の新しい機構ならびに重要な利点および改善点が提供される。

本発明の概念および具体例を3つのセクションで記載する。第1のセクション「基本デバイスの設計および加工」は、基本的な下部超小型電子技術デバイスの設計、およびマイクロリソグラフィーおよびマイクロ-マシーン加工技術の双方を用いた該デバイスの加工を記載している。第2のセクション「デバイスの自己指定されたアドレッシング」は、デバイスの自己アドレッシングおよび自己組立て、特に各超微細-位置への特異的結合物質の迅速な輸送および付着を記載している。第3のセクション「デバイスの適用」は、デバイスが種々の複数工程の、組合わされた、複合の反応をいかに電子制御するかを記載している。また、この

セクションは、デバイスの種々の用途および適用を記載している。

#### I. 基本デバイスの設計および加工

デバイスに複数工程かつ複雑な反応を行わせるために、その電子部品は水溶液中で能動的な作動を維持できなければならない。この要件を満たすために、各超

微細-位置は下部の制御可能かつ機能性のDCモードの超微細-電極を有していなければならない。しかしながら、活性なDC電極表面上で起こる電解反応によって結合反応および親和性反応が影響されないということは、デバイス性能、特に感度(ノイズに対するシグナルの比)に重要である。デバイスの設計および加工に関する他の考慮には、限定するものではないが、物質適合性、特異的結合物質および続く反応物および分析物の性質、および超微細-位置の数が含まれる。

「制御可能かつ機能性のDCモード超微細電極」とは、制御可能な様式で荷電した特異的結合物質、反応物、または分析物を該デバイスのいずれかの位置に、またはそこから、あるいは試料溶液からの自由フィールド電気泳動輸送に影響するか、またはそれを引き起こすことができる、直流モード(連続またはパルスのいずれか)で操作される、正または負のいずれかに偏倚した超微細電極を意味する。

本発明の範囲内で、分子の自由フィールド電気泳動輸送は、絶縁材によって結合されるか、または制限されて作り出される電場には依存していない。従来の電気泳動分離技術には、絶縁(非-導電性)材によって電界列が制限されているか、または閉じ込められていることが必要であった。自由フィールド電気泳動輸送の場合には、荷電分子が1つの超微細位置から他のいずれかの超微細位置へ移動するか、またはバルク溶液から特異的超微細位置に移動する。従って、絶縁材による特殊な配置または制限は、本発明のこの態様には必要でない。

デバイスは、2つくらいの少ないアドレス可能な超微細位置、または数十万ほど多くの超微細位置を有するように設計することができる。一般的には、多数の超微細位置を有する複合デバイスは、マイクロリソグラフィ技術を用いて加工される。加工は、ケイ素、またはガラス、二酸化ケイ素、プラスチックもしくは

はセラミック材のごとき他の適当な基板材料上で行う。これらの超小型電子技術「チップ」の設計は、考慮された大規模のアレイまたは複合分析デバイスであろう。少数の超微細位置またはマクロ位置を有するデバイスは、マイクロマシーン加工技術を用いて加工されよう。

アドレス可能な超微細位置は、いずれの形状とすることもでき、好ましくは、

円形、正方形または長方形とすることができる。アドレス可能な超微細位置のサイズは、いずれのサイズとすることもでき、好ましくは、サブミクロン( $\sim 0.5 \mu\text{m}$ ) $\sim$ 数センチメートル( $\text{cm}$ )で、マイクロリソグラフィー技術を用いて作製するデバイスには  $5 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$  が最も好ましい範囲で、マイクロマシーン加工技術を用いて作製するデバイスには  $100 \mu\text{m} \sim 10 \text{mm}$  が最も好ましいサイズである。マイクロリソグラフィー法の分解能よりも小さな超微細位置を作製するためには、電子ビーム・リソグラフィー、イオンビーム・リソグラフィーまたは分子ビーム・エピタクシーのごとき技術が必要であろう。顕微鏡位置は分析および診断型の適用には望ましいが、限定するものではないが、分取スケールの生体高分子合成、試料調製、試薬の電子工学的調剤のごとき適用には、より大きなアドレス可能な位置またはマクロ-位置(例えば、 $5 \text{mm}$  より大きい)が望ましい。

マイクロリソグラフィーおよび/またはマイクロマシーン加工技術を用いることによって超微細位置を作製した後に、化学修飾、重合反応、またはなおさらにマイクロリソグラフィー加工技術を用いて、特別の付着層および浸透層を作る。これらの重要な層は、電極の金属表面から結合物質を隔離する。これらの重要な構造によって、各超微細位置表面下の DC モードの超微細電極が：(1) 特異的(荷電)結合物質が 1 の超微細位置表面から他の超微細位置表面への、あるいはバルク溶液から特異的超微細位置への自由フィールド電気泳動輸送に影響するか、またはそれを引き起こすことができ；(2) 特異的結合物質を特異的超微細位置の特別に修飾された表面へ濃縮し共有結合させることができ；(3) 他の反応物および分析物が制御された様式にて超微細位置へ、またはそこから輸送されるように、特異的結合物質を付着させた後に DC モードで能動的に機能させ続けることができる。

き；かつ、(4) 電気化学反応および生成物との結合反応または親和性反応に悪影響しないようにすることができる。

#### I(a) 設計パラメーター(マイクロリソグラフィー)

図 1 はマイクロリソグラフィー技術を用いて加工した自己アドレス可能な超微

細位置の基本設計を示す。3つの超微細位置(10)(ML-1、ML-2、ML-3)が、絶縁材層/基板材上に沈着させてある金属部位(12)上の表面に形成されている。金属部位(12)は下部超微細電極構造(10)として作用する。絶縁材は、金属部位(12)を相互に隔離する。絶縁材には、限定するものではないが、二酸化ケイ素、窒化ケイ素、ガラス、レジスト、ポリイミド、ゴム、プラスチックまたはセラミック材が包含される。

図2はマイクロリソグラフィーにより作製した金属部位(12)上に形成させた個々の超微細位置(10)の基本的特徴を示している。アドレス可能な超微細位置が金属部位(12)上に形成され、酸化層(20)、浸透層(22)、付着層(24)および結合物質層(26)を組み込んでいる。浸透層の共有結合カップリングのために、金属酸化物層は、ベースを供する。表面コーティング化学の当業者に知られている金属酸化物およびヒドロキシル基(単独または組み合わせ)、ならびに他の材は、そこから浸透層が構築または支持される共有結合部位を供することができる。浸透層が実際に金属電極表面に共有結合していることは絶対に必須ではない。浸透材の物理的重複は、本発明の範囲内にある別法を表している。

浸透層によって、金属表面および付着および/結合物質層の間に間隔が供され、これは、溶媒分子、小さな対イオン、および電解反応ガスが金属表面へ、またはそこから自由に通過できるようにする。電解反応の物理学および化学的に不利な効果を減少させることができる浸透層材には、限定するものではないが、 $H_2$ に対するパラジウムのごとき酸化還元反応捕捉物質、ならびに $O_2$ および過酸化物に対する鉄錯体を含ませることができる。マイクロリソグラフィーにより作製したデバイスの浸透層の厚さは、約1ナノメートル(nm)~100マイクロメートル( $\mu m$ )、最も好ましくは2nm~10 $\mu m$ の範囲とすることができる。

付着層によって、結合物質の共有結合用の基板が提供される。マイクロリソグラフィーにより作製したデバイスの付着層の厚さは、0.5nm~5 $\mu m$ 、最も好ましくは1nm~500nmとすることができる。ある種の場合においては、該浸透層および付着層は、同一の材から形成させることができる。結合物質のカップリングのためにさらに活性化できるある種の浸透層材も本発明の範囲内に包

含される。

特異的結合物質は、付着層に共有結合し、特異的結合物質層を形成する。理想的には、該特異的結合物質層は、通常、単層の特異的結合分子である。しかしながら、ある場合においては、該結合物質層は数層または多層の結合分子を有することができる。

浸透層および付着層のある種の設計および機能態様は、物理的(例えば、サイズおよび形)および特異的結合性物質分子の特性によって指示される。また、それらは、続いて超微細位置まで輸送され、それに結合するであろう反応物および分析物分子の物理学および化学的特性によってある程度指示される。例えば、オリゴヌクレオチド結合物質は、DCモード機能の損失を引き起こすことなしに、1つの型の超微細位置表面に付着することができ、すなわち、該下部超微細電極は、下部電気泳動輸送は、オリゴヌクレオチド結合性物質が付着する表面に、またはそこから他の分子の迅速な自由フィールド電気泳動輸送をまだ引き起こすことができる。しかしながら、大きな球状蛋白質結合物質(例えば、抗体)が同じ型の表面に付着する場合、それらは、表面を絶縁し、DC様式機能の低下または完全な喪失を引き起こし得る。大きな結合物質(例えば、大きな球状蛋白質)の数が減少するか、または表面上の結合物質間をとるよう、付着層の適当な修飾は行わなければならないであろう。

超微細位置間の間隔は、作製の容易さ、超微細位置間の検出分解能の要件、および装置上の望ましい超微細位置数によって決定される。しかしながら、超微細位置(すなわち、下部超微細電極)のいずれの組合せでも完全なデバイス領域上で操作できる点において、超微細位置間の特定の間隔、または超微細位置の空間配置もしくは構造は、デバイス機能に必要でない。あるいは、誘電体または絶縁遮

断材でデバイスを封じ込める、または超微細位置を完全に隔離することも実際必要ではない。このことは、複合電子フィールドのパターンまたは誘電体境界が、いずれかの電極間の空間または媒質中で特異的分子を選択的に移動し、分離し、固定し、または方向付ける必要がないためである。特異的結合分子ならびに続く分析物および反応物がアドレス可能な超微細位置の表面に付着することによっ

てデバイスはこのことを達成する。自由フィールド電気泳動の推進力によって、デバイス上のいずれかの位置および全位置の間のいずれの荷電分子の迅速かつ直接的な；またはバルク溶液から超微細位置への輸送が供される。しかしながら、流体容器およびバイオハザード目的のためにデバイスを取り囲むであろうことは指摘しなければならない。

数百個を超えて超微細位置の数が増加するにしたがって、該超微細位置の下部回路の複雑性も増大する。この場合においては、超微細位置のグルーピングパターンを変化させ、空間距離も比例的に増加させなければならず、あるいは複層回路を基礎デバイスに作製することができる。

特異的結合物質でアドレスした超微細位置に加えて、他の機能を提供する非-分析超微細位置およびマクロ位置が該デバイスには含まれているであろう。これらの超微細位置またはマクロ位置を用いて試薬を保存し、反応物、分析物もしくは細胞を一時的に保存することができ；かつ、過剰量の反応物、分析物または試料中の他の阻害成分のための一回使用ユニット(すなわち、試薬調剤系および試料調製系)として用いることができる。他の非アドレス超微細位置をアドレスされた超微細位置と組み合わせて使用して、これらの特異的超微細位置で生じる反応に作用または影響することができる。これらの超微細位置は、デバイス間およびデバイス内の活性および制御の双方に付加される。かくして、2つの離れたデバイスの間で相互作用し輸送することも超微細位置には可能である。このことによって、保存デバイスからの結合物質または反応物で作動デバイスをロードする機構、試料調製の機構、およびデバイスをコピーまた複製する機構が提供される。

図3は、64個のアドレス可能な超微細位置(30)を含有するマトリックス型のデバイスを示している。64個の超微細位置デバイスは簡便な設計である。そ

れは、標準的な超小型電子技術チップ・パッケージング構成要素と嵌合する。かかるデバイスは、64個の超微細位置を含有する $750\mu\text{m} \times 750\mu\text{m}$ の中枢領域で、約 $1.5\text{cm} \times 1.5\text{cm}$ のケイ素チップ基板上に作製する。各超微細位置(32)は、近隣の超微細位置と $50\mu\text{m}$ 離れている約 $50\mu\text{m}^2$ である。各個々の下部超微細電極用の接続回路は、金属接触パッド( $300\mu\text{m}^2$ )(34)の外

側周辺部(10 mm×10 mm)を走っている。せり上がった内側周辺部は、超微細位置を有する領域および接触パッドの間に形成でき、約2～10 μlの試料溶液を保持できるキャビティを形成する。「チップ」は標準クアドパッケージ中にマウントすることができ、チップ接触パッド(34)は該クアドパッケージのピンに配線する。1を超えるチップおよびさらなるパッケージングおよび周辺構成要素を含有するシステムは、臨床診断、すなわち試料物質の添加、流体の移動およびバイオハザード物質の封じ込めに関連する問題を扱うように設計することができる。次いで、パッケージングしたチップは、該デバイスを制御し操作できるマイクロプロセッサ制御DC電力供給源およびマルチメータ器具に接続することができる。互いに実質的に挟まれるであろう3種の基本構成要素の取り込みがデバイス製造(アドレッシング前)に最終的に含まれるであろうということが本発明によって意図される。それに結合物質が付着する基本チップデバイスは中間位置にあるであろう；試料または流体容器構成要素は基本チップデバイスの頂点上でアニーリングされるであろう；超小型電子技術検出器および外部コントローラ構成要素は基本チップデバイスの底部にアニーリングされるであろう。この戦略により、作製技術および物質適合性に関連する多数の問題が解決される。

#### I (b) マイクロリソグラフィー作製法

##### I (b)(1) 作製工程

一般的なマイクロリソグラフィー技術または写真平板技術を、膨大な数の小さな超微細位置を有する複合「チップ」型デバイスの作製に用いることができる。デバイスの作製には複雑写真平板技術は必要でないが、材の選択、および水溶液中で電子工学的デバイスを有効に機能させるという要件には特別な配慮がまさに必要である。

図3に示す64個の超微細位置デバイス(30)は、相対的に単純なマスク設計および標準的なマイクロリソグラフィー技術を用いて作製することができる。一般的に、基板材は1～2 cm<sup>2</sup>のシリコン・ウェハーまたは厚さ0.5 μmのチップであろう。シリコンチップは、プラズマ加熱化学蒸気沈着(PECVD)によって適用する、厚さ2 μmの二酸化ケイ素(SiO<sub>2</sub>)絶縁コートで最初に保護膜形

成する。

次工程において、真空蒸発によって $0.2 \sim 0.5 \mu\text{m}$ の金属層(例えば、アルミニウム)を沈着させる。また、スパッタリング技術によって金属を沈着させることもできる。アルミニウムに加えて、回路に適当な金属および材料には、金、銀、スズ、チタン、銅、白金、パラジウム、ポリケイ素、炭素および種々の金属の組合せが含まれる。絶縁基板材( $\text{SiO}_2$ )に適当に粘着させる特別な技術は異なる金属で用いる。例えば、周辺接触パッド用にアルミニウム、相互連結回路用にポリケイ素、超微細電極用に貴金属(金または白金)を用いるように、異なる金属および他の材をデバイスの異なる導電性構成要素に用いることができる。

次いで、チップを正荷電のフォトレジスト(シプレー(Shipley)、マイクロポジットAZ1350J)で保護膜形成し、回路パターンでマスク(明場(light field))し、露光し現像する。該フォト溶解したレジストを除去し、露光アルミニウムをエッチングする。今度は、アルミニウム回路パターンをチップ上に残しつつ、レジストのアイランドを除去する。これには、金属接触パッドの外側周辺部、接続回路(配線)、およびアドレス可能な超微細位置の下部基板として供される超微細電極の中核アレイが含まれる。

PECVDを用いると、該チップを最初に $0.2 \sim 0.4 \mu\text{m}$ の $\text{SiO}_2$ 層で、次いで $0.1 \sim 0.2 \mu\text{m}$ の窒化ケイ素( $\text{Si}_3\text{N}_4$ )層で保護膜形成する。次いで、チップを正のフォトレジストで被覆し、接触パッドおよび超微細電極位置用にマスクし、露光し現像する。フォト溶解したレジストを除去し、 $\text{SiO}_2$ および $\text{Si}_3\text{N}_4$ 層をエッチングしてアルミニウム接触パッドおよび超微細電極を露光する。次いで、周囲のアイランド・レジストを除去すると、接触パッドおよび超

微細電極の間の接続配線が $\text{SiO}_2$ および $\text{Si}_3\text{N}_4$ 層によって絶縁されたまま残る。

$\text{SiO}_2$ および $\text{Si}_3\text{N}_4$ 層は該デバイスの機能性に重要な特性を供する。第二の $\text{SiO}_2$ 層はアルミニウム回路とのより良好な接触および改善された密閉性を供する。また、レジスト材を用いて絶縁し密閉することもできる。このことによって、超微細電極が作動開している際の電解効作用による回路の掘削が防がれる



。Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>を、被覆する最終表層として用いる。なぜなら、特異的結合物質に付着する超微細電極表面を修飾するのに使用する続く試薬とそれが顕著に反応性が低いためである。

#### I(b)(2) 浸透層および付着層形成工程

この時点で、デバイス上の超微細電極位置は、特殊化した浸透層および付着層で修飾する準備ができています。このことは本発明の重要な態様である。目的は、選択的な拡散特性を有する中間浸透層および最適な結合特性を有する付着表面層を超微細電極上に作製することである。

最適には、該付着層は特異的結合物質が付着するために、 $\mu\text{m}^2$  当たり  $10^5 \sim 10^7$  個の官能基化位置を有する。特異的結合物質の付着は、官能化から下部超微細電極が保護されるよう、表面を保護膜形成または絶縁してはならない。官能化デバイスには、ある画分(～5%ないし25%)の能動的金属超微細電極表面が溶媒(H<sub>2</sub>O)分子に依然として接近でき、かつ対イオン(例えば、Na<sup>+</sup> および Cl<sup>-</sup>) および電解ガス(例えば、O<sub>2</sub> および H<sub>2</sub>)の拡散が生じ得ることが必要である。

また、中間浸透層も拡散が生じるように設計されている。加えて、該浸透層は、超微細電極表面との物理学的接触から大きな結合物質、反応物および分析物を阻害または妨害するポア限界特性を有していなければならない。浸透層は、超微細位置の結合物質とは物理学的に異なる能動的超微細電極表面を維持している。

この設計によって、電気泳動輸送に要する電解反応を超微細電極表面上で生じさせることができるが、結合物質、反応物および分析物に対する不利な電気化学効果が回避される。

また、浸透層は、電解反応で生成する有害な物質(H<sub>2</sub>、O<sub>2</sub>、フリーラジカル等)をスキャベンジする物質を含むよう設計することもできる。この目的のために、浸透層の亜層を設計することができる。

種々の設計および技術を用いて浸透層を作製することができる。一般的な設計には：(1)「ローン(Lawn)」、(2)「メッシュ(Mesh)」および(3)「ポーラス(Porous)」構造が包含される。

ローン型浸透層には、繁茂した芝草に類似した方法で、金属表面から垂直方向

に線状分子またはポリマーを配列させることが含まれる。これらの構造は、垂直構造の間に最小限の架橋を有しつつ、線状またはポリマー性の疎水性分子を金属表面に直接付着させることによって形成できる。理想的には、これらの疎水性線状分子は、金属パッドへ共有結合するのに適した1個の末端、および結合物質の共有結合に適したもう1個の末端を有する二官能基分子である。

メッシュ型浸透層には、架橋の程度によって決定される平均ポアサイズを有するメッシュ様構造を形成するポリマー性分子の不規則な配列が含まれる。これらの構造は、限定するものではないが、ポリアクリルアミド、アガロース、および重合し架橋できる他の生物学的材および非生物学的材のごときハイドロゲル型材によって形成できる。

ポアー型浸透層には、限定するものではないが、ポリカーボネート、ポリスルホンまたはガラス材を含む、層表面の頂点から金属パッドまで直接的にチャンネルまたは孔を形成できる材の使用が含まれる。全ての場合において、該浸透層は、物理学的または化学的に金属表面に固定されていなければならない、官能基を含んでいるか、結合物質がその表面へ付着することができるよう官能化できなければならない。

ローン型構造を作製する1つの好ましい方法には、アミノプロピルトリエトキシラン(A P S)を使用する金属超微細電極表面の誘導化が含まれる。A P Sは、金属およびシリコン表面上で酸化物および/またはヒドロキシル基と容易に反応する。A P Sは、結合物質の続く共有カップリングのための第一級アミン基で、浸透層および付着層を結合させる。表面結合部位によって、A P Sは、わずかに

酸化されたアルミニウム表面上に相対的に高いレベルの官能化(すなわち、多数の第一級アミン)、S i O<sub>2</sub>表面上に中間レベルの官能化、およびS i<sub>3</sub>N<sub>4</sub>表面の非常に制限された官能化を作製する。

A P S反応は、全デバイス(例えば、チップ)表面をトルエン中の10% A P S溶液で50℃にて30分間処理することによって行う。次いで、該チップをトルエン、エタノール中で洗浄し、次いで50℃にて1時間乾燥する。該超微細電極

金属表面は、多数の第一級アミン基( $10^5 \sim 10^6 / \mu\text{m}^2$ )で官能化する。今度は、結合物質を、誘導化した超微細電極表面に共有結合することができる。この「ローン型」浸透層の深さは、ポリオキシエチレン=ビス(アミン)、ビス(ポリオキシエチレン=ビス(アミン))、および他のポリエチレングリコールまたは同様の化合物を用いることによって増加することができる。

A P S 法はオリゴヌクレオチド結合物質の付着によく作用する。図4は、3'-末端アルデヒド誘導化オリゴヌクレオチド(40)をA P S 官能化表面(42)へ付着させる機構を示している。これは1つのアプローチを表しているが、浸透層および付着層を形成する種々の他のアプローチも可能である。これらには、塩基電極自体が：(1)塩基超微細電極に電気メッキすることにより二次金属層を形成する；(2)超微細電極位置への電気重合により浸透層を形成する、または(3)自由フィールド電気泳動工程によって活性化ポリマーおよび試薬を超微細電極表面に輸送し、続く浸透層および付着層を形成する

ことによる自己-指定アドレッシングの使用が包含される。

#### 1(c). マイクロマシーン加工デバイスの設計および作製

このセクションでは、マイクロマシーン加工技術(例えば、穿孔、粉碎等)または非リソグラフィ技術をいかに用いてデバイスを作製するかを記載する。一般的に、これらのデバイスは、マイクロリソグラフィによって作製されるものよりも相対的に大きな超微細位置( $> 100 \mu\text{m}$ )を有する。これらのデバイスは、分析適用、ならびに生体高分子合成、試料調製、試薬調剤機、保存容器および廃棄処分のごとき、分取型の適用に用いることができる。大きなアドルス可能な位

置は、多量の結合物質を運搬するために三次元形式(例えば、管またはシリンダー)で作製することができる。かかるデバイスは、限定するものではないが、プラスチック、ゴム、シリコン、ガラス(例えば、超微細チャンネル、マイクロキャピラリー等)またはセラミックスを包含する種々の材を用いて作製することができる。低い蛍光性材が分析適用により理想的である。マイクロマシーン加工デバイスの場合、接続回路および大きな電極構造は、当業者に知られている標準的な回路ボード・プリンティング技術を用いて材上にプリントすることができる。

アドレス可能な超微細位置デバイスは、マイクロマシーン加工技術を用いて比較的容易に作製することができる。図5は、96個の超微細位置デバイスの模式図である。この超微細位置デバイスは、材を通して均整をとって間隔を空けた96個の孔(直径1mm)を穿孔することによって、適当な材料台材(2cm×4cm×1cm)から作製する。電極回路ボード(52)は、超微細位置構成要素(54)の上面に正確に嵌合する薄シートのプラスチック材台材上に形成する。回路ボードの下面には、各超微細位置(55)への個々の配線(プリント回路)が含まれる。短い白金電極構造(〜3-4mm)(62)は、個々の超微細位置チャンバー(57)まで延びるよう設計されている。該プリント回路配線は、適当な防水性絶縁材で被覆されている。プリント回路配線はソケットに収束し、これにより複合スイッチ・コントローラー(56)およびDC電力供給源(58)に接続される。デバイスは共通緩衝液貯蔵器(59)中に部分的に浸漬しており、その中で作動する。

マイクロマシーン加工技術およびマイクロリソグラフィー技術によって作製したデバイス中の超微細位置の主機能は同一であるが、それらの設計は異なっている。マイクロリソグラフィーによって作製したデバイスにおいては、浸透層および付着層を下部金属超微細電極上に直接的に形成する。マイクロマシーン加工技術によって作製したデバイスにおいては、浸透層および付着層は、個々のチャンバーまたは容器(57)中の緩衝溶液によって、それらの個々の金属電極構造(62)から物理的に離されている(図6参照)。マイクロマシーン加工デバイスにおいては、該浸透層および付着層は、官能化親水性のゲル、膜、または他の適当な多孔性材を用いて形成できる。

一般的に、結合した浸透層および付着層の厚さは、10μm〜30mmの範囲である。例えば、20%〜35%の(0.1%ポリリジンを有する)ポリアクリルアミド修飾親水性ゲルを用いて、デバイス中の各個々の超微細位置チャンバーを部分的に充填する(〜0.5mm)ことができる。これらのゲル濃度は、ポア限界2nm〜10nmを有する理想的な浸透層を形成する。ゲル中に取り込まれたポリリジンによって、特異的結合物質の続く付着のための第一級アミン官能基が供される。この型のゲル浸透層によって、DC様式で電極を能動的に機能させるこ

とができる。電極が活性化された場合には、ゲル浸透層は、それを通して小さな対イオンは通すが、大きな特異的結合物質分子は外側表面上に濃縮される。ここに、それらが第一級アミンの外側層に共有結合し、これが効率的に付着層となる。

浸透層および付着層の形成のための別の技術は、各超微細位置チャンバーの塩基に多孔性の膜材料に組み込むことである。次いで、膜の外側表面を化学官能基で誘導化し付着層を形成させる。このアプローチを行うのに適当な技術および材は、当業者に知られている。

マイクロリソグラフィーおよびマイクロマシーン加工デバイスの両方の設計および作製についての上記記載は、基本デバイスの他の変形または形態を限定することを意味するものでは決してない。より多数または少数のアドレス可能な超微細位置を有するデバイスの多くの変形、またはデバイスの組み合わせ、異なった分析および分取の適用とすることができる。より大きなアドレス可能な位置を有するデバイスの変形は、分取用生体高分子合成への適用、試料分取、セル・ソーティング系、イン・サイチュ・ハイブリダイゼーション、試薬調剤、保存系および廃棄処理系用に設計することができる。

#### II. デバイスの自己指定アドレッシング

本発明のデバイスは、特異的結合物質で各超微細位置を電子工学的に自己アドレスすることができる。デバイス自体が、荷電特異的結合物質の特異的超微細位置への運搬に直接影響するか、またはそれを引き起こす。結合物質は、それが付着層に容易に反応し共有結合するように、一般的に官能化されている。デバイス

は、ある程度まで外部工程、機構または器具を必要としないで、特異的超微細位置で特異的結合物質を物理的に方向付け、位置決定し、または設置する。この自己-アドレッシング工程は、迅速かつ特異的であり、連続様式または平行様式で行うことができる。

デバイスは、DCモードかつ特異的結合物質のものの反対の電荷(電位)に選択した超微細位置を維持することによって、特異的結合物質で連続してアドレスすることができる。結合物質が正味負の電荷を有する場合には、結合物質が運搬さ

れるべき超微細位置が正に偏倚されよう。反対に、負電荷の超微細位置を用いて正に荷電した結合物質が運搬されるであろう。連続アドレッシング工程中の残りの超微細位置を偏倚させる選択には：反対の電荷(アドレスする超微細位置に対して反対)に全ての他の超微細位置を偏倚させること；反対の電荷に制限された群の超微細位置を偏倚させること；または、反対の電荷で超微細位置(または他の電極)を1個のみ偏倚させることが包含される。ある場合においては、反対の電荷で1またはそれを超える超微細位置を強く偏倚させることが望ましいが、他の群の超微細位置は弱く偏倚させることが望ましいであろう。この工程によって、残りの超微細位置をアドレスする間に、保護すべき超微細位置をあらかじめアドレスすることができる。結合物質が結合位置上の付着部位に過剰にない場合には、1個の他の超微細位置のみに影響して特異的超微細位置まで自由フィールド電気泳動運搬させる必要があり得る。特異的結合物質は、バルク溶液を通して迅速に運搬でき、それが付着層の特殊表面に迅速に共有結合する特異的超微細位置(群)で直接濃縮することができる。運搬速度は、結合物質のサイズおよび電荷、ならびに超微細位置間に用いる電圧および電流のレベルに依存する。一般的に、運搬速度は数秒から数分の範囲とすることができる。特異的超微細位置(72)上に結合物質、反応物、または分析物(72)を電子工学的に濃縮する能力を図7に示す。全ての他の超微細位置は、特異的結合物質アドレッシング工程の間、保護し、未作用のまま残すことができる。いずれの未反応物質も、特異的超微細位置の極性を反対にし、それを廃棄位置まで電気泳動することによって除去される。全ての所望の超微細位置がそれらの特異的結合物質でアドレスされるまで該サイクル

を繰り返す。図8は、特異的オリゴヌクレオチド結合物質(82、84、86)で特異的超微細位置(81、83、85)をアドレスするための連続工程を示している。

超微細位置をアドレスする平行工程には、同一の特異的結合物質を輸送し、濃縮し、1を超える特異的超微細位置と反応するよう、1個の超微細位置(特定基)を同時に活性化することが含まれる。続く平行加工も連続工程と同様である。

### I I I. デバイスの適用

デバイスが特異的結合物質で自己アドレスされれば、種々の分子生物学型の複数工程かつ複合の反応および分析をデバイス上で行うことができる。本発明のデバイスは、多数の重要な反応指標上の能動的かつ動的な制御を電子工学的に供する。この電子工学的制御によって、制御している反応に新たな物理学的機構が誘導され、反応速度、特異性および感度が顕著に改善される。デバイス能力から発生するこれらのパラメーターにおける改善点は：(1)付着した特異的結合物質を含有する超微細位置への反応物または分析物の迅速な輸送；(2)反応物または分析物の濃縮による、特異的超微細位置表面上での特異的結合物質との反応速度の上昇；(3)超微細位置からの未反応および非特異的結合成分の迅速かつ選択的な除去；および(4)最適結合条件の厳格性の電子工学的な制御および直接的作用である。

本発明の自己アドレスされたデバイスは、種々の超微細形式化した複数工程および/または複合の反応および方法；限定するものではないが：

- 従来形式のDNAおよびRNAハイブリダイゼーション工程および分析；  
例えば、付着標的DNA/プローブDNA、付着プローブDNA/標的DNA、付着捕捉DNA/標的DNA/プローブDNA；
- 連続および平行の両様式の複数または複合ハイブリダイゼーション反応；
- 制限断片および一般的DNA/RNA断片サイズ分析；
- 分子生物学的反応、例えば、制限酵素反応および分析、リガーゼ反応、キナーゼ反応、およびDNA/RNA増幅；
- 大きいまたは小さい抗原およびハプテンを含有する抗原/抗体反応；
- 診断アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーション分析(イン-サイチュー・ハイブリダイゼーションを含む)、遺伝子解析、指紋印刷および免疫診断；
- 試料調製、細胞のソーティング、選抜、および分析；
- 生物分子結合法(すなわち、蛍光、化学ルミネッセント、比色基(colorimetric)およびラジオアイソトープを包含するレポーター基での核酸、酵素、蛋白質または抗体の共有結合および非共有結合標識)；

- 生体高分子合成、例えば、オリゴヌクレオチドまたはペプチドの組合せ合成
  - ;
  - 水溶性合成ポリマーの合成、例えば、炭化水素または線状ポリアクリル酸;
- ならびに
- 高分子分子およびナノ構造(ナノメーター・サイズの粒子および構造)合成
- および作製
- を迅速に行うことができる。

### I I I (a) 核酸ハイブリダイゼーション

核酸ハイブリダイゼーションを本発明の主な例として用いた。なぜならば、それらの診断における重要性、およびそれが1を超える困難な型の結合(親和性)反応の特性を表すためである。このことは、各個々のハイブリダイゼーション反応が異なる厳格条件を要する複合様式でそれを行う場合には特に正しい。

特許請求するデバイスおよび方法によって、従来および新たな種々の様式で核酸ハイブリダイゼーションを行うことができる。反応パラメーターを電子工学的に制御するデバイスの能力は、核酸ハイブリダイゼーション分析、特に電子工学的な厳格制御(E S C)をアレイ上の各個々の超微細位置に供する。

「核酸ハイブリダイゼーション」なる語は、デオキシリボ核酸(D N A)、リボ核酸(R N A)、ポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドを包含する全ての天然および合形成態の核酸ならびに核酸誘導体の間の全てのハイブリダイゼーション反応を包含することを意味する。

「ドット・プロット」ハイブリダイゼーションおよび「サンドイッチ」ハイブリダイゼーションのごとき従来のハイブリゼーション形式は、特許請求するデバイスならびに大スケールのアレイまたはマトリックス形式で行うことができる。

例としては、D N Aハイブリダイゼーション分析用のアペックスデバイスを設計し、作製し、以下の様式で用いる。超微細位置のアレイは、マイクロリソグラフィ(またはマイクロマシーン加工)技術を用いて最初に製作される。アレイ上のアドレス可能な超微細位置の数は、最終的な用途に依存する。該デバイスは、特異的オリゴヌクレオチド群と連続様式で迅速に自己アドレスする。この場合、



特異的オリゴヌクレオチドは、6重体～100重体の範囲の3'-末端アルデヒド官能化オリゴヌクレオチドであるが、所望により、さらに長いポリヌクレオチドを付着することができる。アルデヒド官能基は、特異的超微細位置付着表面に共有結合させることができる(図4参照)。この群の特異的オリゴヌクレオチドは、従来技術を用いた従来のDNAシンセサイザー上で容易に合成することができる。各特異的オリゴヌクレオチドの合成は、リボヌクレオチド制御された孔ガラス(CPG)支持体から開始する。かくして、3'-末端位置にはリボヌクレオチドが含有され、次いでこれは末端ジアルデヒド誘導体へ合成され、精製された後に過ヨウ素酸酸化によって容易に転化される。オリゴヌクレオチド(40)を含有するアルデヒドは、シフ(Schiff)塩基反応工程によって、超微細位置表面上の第一級アミン官能基と容易に反応するであろう。

特異的オリゴヌクレオチドとデバイスとの電子工学的アドレッシングを図8に示す。第1の特異的超微細位置(ML-1)(81)とその特異的配列オリゴヌクレオチド(SSO-1)(82)とのアドレッシングは、特異的微小電極(ML-1)を正のDC電位に維持する一方で、全ての他の微小電極を負の電位に維持することにより達成する(図8(A))。水性緩衝液中のアルデヒド官能基化特異的配列(SSO-1)は、ML-1アドレスまで自由フィールド電気泳動され、そこでそれを濃縮( $> 10^6$  倍)すると直ちにML-1(81)の表面に共有結合する。全ての他の超微細電極は負に維持されており、SSO-1配列(82)との反応から依然として保護または遮断されている。次いで、ML-1電位を負(-)に逆転させていずれの非処理SSO-1も廃棄系まで電気泳動する。サイクルは、全ての所望

の超微細位置がそれらの特異的DNA配列でアドレスされるまで、SSO-2(84)→ML-2(83)、SSO-3(86)→ML-3(85)、SSO-n→ML-nを繰り返す(図8(D))。

デバイスをアドレスするもう1つの方法は、電子工学的試薬供給デバイスから特異的オリゴヌクレオチドのごとき特異的結合物質を輸送することである。この供給デバイスは大量の結合物質または試薬を保持し、分析的デバイスを負荷するのに用いられるであろう。結合物質は、2つのデバイス間で電子工学的に輸送さ

れるであろう。この系により、マイクロビペット添加、およびデバイス内またはデバイス間の複雑な流体デリバリー系のごとき物理的操作の必要がなくなった。

デバイスをアドレスするさらにもう1つの方法は、特異的超微細位置で特異的オリゴヌクレオチドの組合せ合成を行うことである。組合せ合成は後のセクションで記載する。

特異的DNA配列でデバイスをアドレスした後も、アレイデバイス上の超微細位置の下側の超微細電極が独立作動性直流(DC)電極のままであることが重要である。下部超微細電極は化学的または物理学的に絶縁されないように電極表面へ付着させるため、このことは可能である。各超微細電極は、超微細位置表面へのおよびそこからの他の荷電DNA分子の自由フィールド電気泳動輸送に必要な強い直流を各超微細電極は依然として作り出すことができる。かくして、DNAアレイ・デバイスは、DNAハイブリダイゼーションの全ての態様およびいずれの他の続く反応にわたり完全に電子制御する。

電子工学的に制御されたハイブリダイゼーション工程の一例を図9に示す。この場合において、各アドレス可能な超微細位置は特異的捕捉配列(90)を有する。標的DNA(92)を含有する試料溶液を該デバイスに付する。全ての超微細位置が活性化され、該超微細位置で試料DNAが濃縮される(図9(B))。希釈溶液からの標的DNA分子が超微細位置に高濃度に濃縮されるようになったことにより、表面上の特異的相補DNA配列に非常に迅速にハイブリダイゼーションさせることができる。超微細電極電位をが逆転させると、全ての非-ハイブリダイゼーションDNAは超微細位置から反発するが、標的DNAはハイブリダイズしたままで

ある(図9(C))。同様な様式において、続く工程でレポーター・プローブをハイブリダイズさせて、ハイブリダイズした複合体を検出する。

ハイブリダイゼーション工程の電子工学的制御は、全体のハイブリダイゼーション効率を向上し、かつ微細位置領域から非-特異的DNAを除去することによって、標的DNA分子の続く検出を改善する。非-増幅ゲノムDNAにおいて10,000~100,000コピーの標的配列が検出できると予想される。この型

のハイブリダイゼーション反応は、プローブ  $T_m$  よりかなり低い等温条件下；最小限の外部操作(すなわち、従来の洗浄工程は完全に除去される)で数分またはそれ未満で行うことができる。

もう1つのDNAハイブリダイゼーションアッセイの通常の形式には、表面上に固定化した標的DNAを有すること、および次いで特異的プローブをこれらの標的DNAにハイブリダイズさせることが含まれる。この形式には、複数位置の同一の標的DNA、または特異的位置の異なる標的DNAのいずれかを含むことができる。図10は、この連続ハイブリダイゼーション形式の改善バージョンを示している。この場合において、超微細位置(101-107)は異なる捕捉DNAでアドレスされる。これらは、オリゴヌクレオチドに特異的な異なる配列と連続様式でハイブリダイズする(108、109)。超微細位置は、順次、正に偏倚させて、分子をそれ自体に輸送し、次いで、負に偏倚させて該分子を次ぎの超微細位置に輸送する。適当な電極電位では、特異的にハイブリダイズしたDNAプローブは超微細位置に残るが、非-ハイブリダイズプローブは次の超微細位置に輸送される。配列特異的オリゴヌクレオチド・プローブは、蛍光発色団のごとき適当なレポーター基で標識することができる。

特許請求するデバイスは、電子工学的な厳格条件を供することができる。厳格制御は、ハイブリダイゼーション特異性に必要であり、点突然変異における一塩基誤対合の解読には特に重要である。図11は、電子工学的厳格制御を一塩基誤対合分析にいかにかに用いることができるかを示している。電子工学的厳格制御は、複数-塩基-誤対合の分析にも適用することができる。図11(A)において、完全対合DNAハイブリッド(110)は、誤対合DNAハイブリッド(112)よりも

僅かに安定である。超微細位置を負に偏倚させ(図11(B))、所定量の電気泳動電力を記載された時間に流すことによって、この誤対合DNAハイブリッドを変性または除去しつつ、完全対合DNAハイブリッドを保持することが可能である(図11(C))。図15は、電子工学的厳格制御を利用した電子工学的ハイブリダイゼーション工程と従来のハイブリダイゼーション工程との結果を比較している。ハイブリダイゼーションには、Ras12オンコジーン突然変異に関する15

重体のGおよびA点突然変異プローブが含まれる。電子工学的ハイブリダイゼーションの結果は、顕著に改善されたハイブリダイゼーション効率と、従来法を上回る一塩基誤対合に関する非常に大きな識別比とを示している。

さらなる改善において、特許請求するデバイスは、該デバイス上で生じる各特異的ハイブリダイゼーション反応に個別の厳格制御を供する。効果において、各ハイブリダイゼーションは独立反応である。従来または受動アレイ形式では、同一ハイブリダイゼーション溶液中に生じる全てのハイブリダイゼーション事象について最適な厳格性を達成することは不可能である。しかしながら、本発明の能動的アレイ・デバイスは、それらが同一のバルクハイブリダイゼーション溶液中で生じる場合でさえ、異なる超微細位置におけるハイブリダイゼーションに異なる電子工学的厳格性を供することができる。このことは、従来のマトリックスまたはアレイ・ハイブリダイゼーション形式、ハイブリダイゼーション形式による配列決定(SBH)、および他の複合分析の生来の限界を克服するのに貢献している。

ハイブリダイゼーションの特異性(すなわち、識別比)および(単一の点突然変異の検出のごとき)感度を改善することに加えて、電子工学的厳格制御によって、通常の範囲外のオリゴヌクレオチドをこれらの適用に用いることができる。8重体〜21重体の範囲のオリゴヌクレオチドは、従来のハイブリダイゼーション法で点突然変異検出が可能と考えられる。従来のハイブリダイゼーション法を用いた最近の実践においては、10重体〜19重体のオリゴヌクレオチドを、厳格制御の温度および塩濃度を利用するこれらの従来法で最も頻繁に用いている。10重体よりも短いオリゴヌクレオチドは、複合ハイブリダイゼーションに許容でき

なく；8重体よりも短い配列は、ハイブリダイゼーション効率が不足しているため、使用さえ考えられないことが判明した。21重体を超える長い配列も用られない。なぜなら、対合および誤対合のプローブ間の識別比をそれらが非常に少ししか有していないためである。配列長が21重体を超えて長くなるにしたがい、対合および誤対合プローブ間のハイブリダイゼーション・シグナルの差を識別す

る能力は顕著に低下する。

本発明者らは、電子工学的厳格制御を有するAPEXデバイス上でのハイブリダイゼーションを、非常に高い識別比で短い(7重体およびそれ未満のもの)および長い(22重体およびそれを超えるもの)両方のオリゴヌクレオチドにも用いることができることを発見した。短いオリゴヌクレオチド配列(7重体またはそれ未満のもの)は、ハイブリダイゼーションによる配列決定(SHB)に利点を有している。短い長さの配列は、このSBHについて用いるべき少数のオリゴヌクレオチド(8重体=65,536、7重体=16,384、6重体=4,096)と整列させることができる。長い配列(22重体およびそれを超えるもの)を電子工学的厳格突然変異分析と共に用いると、より感度が高く、選択的な突然変異分析を行うことができる。より長いプローブを使用することにより、非常に複雑なDNA試料において高感度を提供することができ、また高い全体ハイブリダイゼーション効率を提供することもできる。

電気ハイブリダイゼーション技術を用いてイン-サイチュ・ハイブリダイゼーションを行うことができる。イン-サイチュとは、細胞から標的DNA(またはRNA)は除去されるが、その内側を直接検出するという基本的に異なったハイブリダイゼーション形式を表す。イン-サイチュ・ハイブリダイゼーション法は一般的には複雑で、時間がかかり、かつ短い標的配列(すなわち、単一の点突然変異)を検出することはほとんど不可能である。電子工学的に制御されたイン-サイチュ・ハイブリダイゼーションは、当該デバイスの活性表面上で直接細胞に付着し、加工するAPEXデバイス上で行うことができる(試料調製技術については実施例14参照)。しかしながら、細胞からDNAを抽出するよりもむしろ、該APEXデバイスはレポーター・プローブを細胞内のDNAに直接的に電子工

学的にハイブリダイズさせる。電子工学的厳格制御を用いれば、非-特異的結合を大部分除去し、全体のハイブリダイゼーション効率を改善することによって、選択性および感度の双方が向上する。また、電子工学的厳格制御がハイブリダイゼーションに供する能力は、レポーター基標識DNAプローブを用いることなくDNAハイブリダイゼーションを検出する新たな機構も提供する。それは、ハイ

ブリダイゼーション工程自体のさらに直接的に検出する方法を提供する。蛍光色素検出工程を図12に示し、実施例4および6に記載する。DNAハイブリッドの直接検出は、臭化エチジウムのごときDNA結合色素を用いることによって達成できる。該色素は二本鎖および一本鎖DNAの双方に結合するが、前者により大きな親和性を有する。図12(B)において、正に電荷した色素(122)は、負に偏倚した超微細位置に輸送される。該色素は、ハイブリダイズした(120)および非-ハイブリダイズ(121)のDNA配列の双方に結合する(図12(C))。超微細位置を正に偏倚し、所定量の電力を所定時間流すことによって、該色素分子が非-ハイブリダイズ超微細位置に結合して選択的に除去される。DNAハイブリッドに有害に作用しない適当な電流量を供することができる。次いで、色素分子と結合したハイブリダイズDNAを、結合または集積光学システムを用いて蛍光検出する。

本発明のデバイスによって、以下の反復する重要な利点が核酸ハイブリダイゼーション反応および反応に供される：

(1)希釈された標的DNAおよび/またはプローブDNA配列の、ハイブリダイゼーションが起こる特異的超微細位置(群)への迅速な輸送。この工程は、5～120秒の範囲で起こすことができる。

(2)希釈された標的DNAおよび/またはプローブDNA配列の、ハイブリダイゼーションが起こる特異的超微細位置(群)での濃縮。濃縮効果は、恐らくは百万倍( $> 10^6$ )をはるかに超える。

(3)非-特異的結合標的DNA配列の、ハイブリダイゼーションが起こる特異的超微細位置(群)からの迅速な除去。この工程は、5～120秒の範囲で起こすことができる。

(4)競合する相補的標的DNA配列の、ハイブリダイゼーションが起こる特異的超微細位置(群)からの迅速な除去。この工程は、5～120秒の範囲で起こすことができる。

(6)多数の独立したハイブリダイゼーション反応を数分間で行うことができる能力。

(7)プローブの $T_m$ よりはるかに低い等温条件かつ、最小限の外部操作または洗浄工程でハイブリダイゼーション工程を行うことができる能力。

(8)部分ハイブリダイズDNA配列を除去するための電子工学的厳格制御(ESC)の使用。

(9)1,000~100,000コピー範囲の非増幅ゲノム標的DNA配列のハイブリダイゼーション分析を行うことができる能力。

(10)単一塩基誤対合ハイブリダイゼーション(点突然変異)の識別比(すなわち、分解能)および感度を改善するためのESCの使用。

(11)従来のハイブリダイゼーション法で用いられていたものよりも短い(7重体およびそれ未満のもの)または長い(22重体またはそれを超えるもの)か、いずれかの単一点突然変異プローブを使用できる能力。

(12)マトリックス・ハイブリダイゼーションに個々の厳格制御を供するためのESCの使用。

(13)非-特異的バックグラウンド成分を除去することによるハイブリダイゼーション事象の検出を改善すること。

(14)固定化細胞で電子工学的イン-サイチュ・ハイブリダイゼーションを行うことができる能力。

(15)ハイブリダイゼーションを検出するために共有的に標識したレポータープローブまたは標的DNAを用いる必要性がない検出方法の開発。

#### III(b) デバイスの再現性

特異的結合物質で個々のデバイスを別々にアドレッシングすることに加えて、特異的結合物質を他のデバイスにコピーできるマスターデバイスを作製すること

も可能である。このことは、デバイスの作製または製造のもう1つの方法を表している。デバイス複製の工程を図13に示す。特異的結合配列でアドレスされた超微細位置を含むマスターデバイスを、各々の相補的DNA配列(130)とハイブリダイズさせる。これらの相補的配列は活性化され、それ故、超微細位置付着層に共有結合できる。

付着層を含有する非アドレス姉妹デバイス(132)を、ハイブリダイズしたマ

スターデバイスと比較した(図13(B))。マスターデバイスの超微細位置は負に偏倚しており、姉妹デバイスの超微細位置は正に偏倚している。DNAハイブリッドを電子工学的に変性し、活性化DNA配列が超微細位置に共有結合する姉妹デバイスまで輸送する(図13(C))。超微細位置間のクロストークが最小限化されるようなデバイス構造に依存して、該工程は平行または連続で行うことができる。ハイブリッドは、十分な負電位を適用することによって、または正に電荷したカオトロピック剤または変性剤を用いることによって変性することができる。

#### III(c) 構成要素デバイスおよび集積APEXシステム

多くの別々のAPEXデバイスまたはチップを組み合わせて集積APEXシステムを構築することができる。APEX型のデバイスは多くの異なる機能を実行することができ、かつ反応物を自由フィールド電気泳動によって移動させることができるため、集積システムを開発することができる。例えば：(1)選択的に結合し細胞を溶解し、(2)試薬を電子工学的に調剤し、(3)プレ-ハイブリダイゼーションを行い、(4)廃棄処理ユニットとして作用させ、(5)DNA断片を保存し、および(5)ハイブリダイゼーション分析を行う

別々のAPEXデバイスまたはチップを組み合わせて試料調製およびハイブリダイゼーション分析システムを構築することができる(実施例14および図19参照)。これらの集積APEX超小型電子工学システムは、完全な臨床分析器またはプログラム可能な分子生物学研究室と同等である(すなわちチップ上の研究室)。しかしながら、それが試料、試薬および反応物の最小限の流体力学または物理的操作しか要しない点において、それは自動制御(ロボット工学)または他の微細分

析デバイスを超えている。集積APEXシステムのさらなる型には、限定するものではないが、イン-サイチュ・ハイブリダイゼーションを行うことができるもの、セル・セクターおよびプロセッサー・システム、ならびに免疫診断分析器が包含されよう。

#### III(d) 検出システムおよびレポーター基

蛍光標識レポーター基を含む結合反応の場合、結合反応を分析するためにエピ



蛍光型の顕微鏡検出システムをA P E Xデバイス上で使用することができる。該システムの全体的な感度は、組み合わせた検出構成要素(冷却電荷結合デバイス(C C D)、増強電荷結合デバイス(I C C D)、マイクロチャネル・プレート検出器、またはフォトン計数フォト乗算機(P M T)システム)に依存する。別法として、高感度C C Dチップ検出器またはアバランシェ・フォトダイオード(A P D)検出器をA P E Xデバイスとさらに直接的に組み合わせることもできる。これらのシステムは、複合光学の必要性を幾分減じるものであろう。さらに進歩したシステムには、A P E Xチップへオプト・エレクトロニクスのまたは電子工学的検出素子を組み込むことが含まれるであろう。D N Aの光学のおよび直接的電子工学的検出の双方が、これらのシステムで可能である。最も進歩したバージョンには、究極的に超小型電子検出器と共にオン-ボード・コントローラー構成要素を基本A P E Xチップ構成要素にサンドイッチすることが含まれよう。電子工学的および光学的(導波管)な回路は、A P E X構成要素の底部を通して直接的に作製されるであろう。この戦略によって、A P E X構成要素を使い捨てとするための作製技術、材料適合性、およびコスト効率に関連する多数の問題が解決される。

D N Aプローブ、標的D N Aまたは抗体を標識するのに用いることができる種々の蛍光色素およびレポーター基に加えて；他の型の標識またはレポーター基も用いることができる。これらには、化学ルミネッセンス標識、非-線形光学(周波数ダブラー)材料、ビオチン/アビジン複合体および種々の酵素が包含される。

### I I I (e) 組合せ生体高分子合成

本発明のデバイスは、オリゴヌクレオチドおよびペプチドのごとき生体高分子の組合せ合成を行うこともできる。かかる工程によって、外部の検出、影響または機械運動を全く必要としないで自己指定の合成を行うことができる。組合せ合成の他の工程には、顕微鏡位置において実際の合成を行うために、物理的保護および複合フォトリソグラフィ法、試薬デリバリーのためのマイクロロボット・ピペッティング・システム、またはコンポーネントの複雑な物理運動が必要である。本発明に開示した組合せ合成によって、非常に多数の配列をデバイス上で合成することができる。組合せ合成の基本概念には、輸送してデリバリーし、濃縮

し、モノマーを反応させ、デバイス上の特異的地址可能な微細-微細位置で試薬をカップリングし、または試薬を脱ブロッキングするための自由フィールド電気泳動を使用することが含まれる。該概念はデバイスの本来の能力を利用して、近隣の試薬および反応物の作用から他の超微細位置を電子工学的に保護する。

1 またはそれを超える反応物が正味正または負に荷電するか、またはこれらの工程に適したかかる試薬を作り出すかのいずれかであるこれらの化学合成工程における選択工程の同定も該概念に重要である。

組合せオリゴヌクレオチド合成の1つの方法を図14に示す。この方法は、1セットの選択的にアドレス可能な超微細位置(140)で開始し、該超微細位置の表面はブロックされた第一級アミン(X-NH-)基(142)で誘導化されている。該工程における最初の工程には、電荷脱ブロッキング試薬(144)を用いた超微細位置の選択的脱ブロッキングが含まれる。この場合において、該試薬は正(+)電荷に帯電しているであろう。該工程は、脱-ブロックしたそれら超微細位置に負電位を適用し、正電位を保護されたままの超微細位置に適用することによって行う(図14(B))。正および負電位を選択電極に適用することによって、他の超微細位置からの試薬を排除しつつ、荷電試薬を試薬デリバリー部位から移動させ、脱-ブロックすべき所望の超微細位置に濃縮する。

第二工程において、システムをホスホルアミダイト試薬(x-C)(146)に単に暴露することによって、最初の塩基、この場合にはシトシンの脱ブロック超微細位置への化学カップリングが行われる。(C)ヌクレオチドは脱-ブロックされ

た超微細位置表面にはカップリングするが、ブロックされた電極表面には全くカップリングしない(図14(C)および(D))。この時点で通常のホスホルアミド化学が次の脱-ブロッキング工程まで行われる。

第二脱ブロッキング工程で(図14(D))、次の塩基でカップリングすべき電極位置を負とし、保護したままの位置を正とする。今度は、カップリングすべき次の塩基に該システムを暴露し、この場合(x-A)(148)では、脱-ブロッキングした超微細位置への選択的なカップリングが達成される(図14(E)および(F))。カップリングおよび脱-ブロッキング法は、異なるDNA配列の全部が各アド

レス可能な超微細位置表面上で合成されるまで繰り返される。

前記の例は、核酸合成の1つの可能なアプローチを表している。もう1つのアプローチには、完全水溶性DNA合成が含まれる。この場合において、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDCA)のごとき荷電した水溶性カップリング剤を用いて、水溶性核酸誘導体と共にオリゴヌクレオチド合成を行う。このアプローチは、塩基の広範なブロッキングを要する現在の有機溶媒に基づく技術を上回る重要な利点を有するであろう。水溶性合成は、より安価で、かつ現在の有機溶媒に基づく工程で用いる多くの有害な物質の使用がなくなるであろう。第三のアプローチ、再水溶性合成には、荷電モノマーおよび酵素の使用が含まれる。

#### III(e)(1) ターミナル・トランスフェラーゼを用いたオリゴヌクレオチド合成

オリゴヌクレオチドの組合せ合成に関するこのアプローチには、核酸重合酵素を使用することが含まれる。このアプローチはターミナルトランスフェラーゼ、5'-デオキシリボヌクレオチド三リン酸の3'-モノリン酸エステル、およびホスファターゼを利用する。ターミナル・トランスフェラーゼを用いてヌクレオチドをカップリングする。該3'-リン酸エステルは、各カップリング工程において2個以上のヌクレオチドが付加するのを防ぐブロッキング基として作用する。次のカップリング工程のために、3'-ホスファターゼを用いて3'-リン酸エステルを除去する。

全ての試薬は水溶性であり荷電しているため、この組合せ合成法の全ての工程に一般的なAPEX技術を用いることができる。このアプローチにおいては、それらの5'-ヒドロキシル位を介してデバイス上の適当な数のアドレスされた超微細位置に連結しているA、T、GおよびCヌクレオチドを有するAPEXマトリックスを用いる。第一のヌクレオチドは標準的APEXアドレス技術に連結する。

カップリング反応の第1ラウンドは、その第二位でAヌクレオチドとカップリングされるべき全ての超微細位置を正に偏倚させ、次いでターミナル・トランス

フェラーゼおよびデオキシアデノシン三リン酸の3'-リン酸エステルを含有する2つの電子工学的な試薬調剤器を負に偏倚させることによって開始する。該試薬は適当な超微細位置に自由フィールド電気泳動され、マトリックス上で、ターミナル・トランスフェラーゼによってAヌクレオチドが最初のヌクレオチドにカップリングされる。ヌクレオチド三リン酸はその3'位でリン酸基でエステル化されるため、ターミナル・トランスフェラーゼは1個のみのヌクレオチドを同時に付加する。

ヌクレオチド・カップリングが完了した後、該超微細位置を負に偏倚し、廃棄処理系を正に偏倚すると、酵素および消費された試薬が除去される。該工程を、全ての超微細位置がカップリングされるまで、G、CおよびTヌクレオチドの第1ラウンドカップリングの間、繰り返す。

カップリングの第1完全ラウンド(A、T、GおよびC)が完了する時に、全ての超微細位置を正に偏倚し、3'-ホスファターゼ酵素を有する試薬調剤器を負に偏倚させる。3'-ホスファターゼ酵素は、超微細位置まで自由フィールド電気泳動され、そこでそれは3'-リン酸エステルを加水分解する。リン酸エステルを除去すると3'-リン酸エステルが残り、次のラウンドのカップリング反応の準備ができる。該カップリング反応は、所望のオリゴヌクレオチド配列がA P E Xデバイス上で完了するまで行う。

DNA合成に加えて、同様な工程をRNA合成、ペプチド合成、および他の複合ポリマーに発展させることができる。

### III(f) 電子工学的に制御された分子生物学反応および増幅反応

標的DNAおよびRNA分子の線形および指数関数的な増加および増幅を包含する種々の分子生物学的反応を、A P E X超小型電子デバイスおよびチップで行うことができる。

制限酵素切断反応およびDNA断片分析は、完全な電子工学的制御下で行うことができる。A P E Xデバイスを用いた核酸の増加および増幅反応は、従来の増幅方法(PCR、LCR等)用の基本的には受動的な微細-マトリックス支持体である他の「DNAチップ」デバイスとは異なる。増幅の新規な機構は、A P E

Xデバイスの能動的な性質から直接的に生じる。能動的なデバイスによって：(1)等温反応条件かつその $T_m$ 点よりもはるかに低い温度(熱溶解温度)下でDNAハイブリッドを選択的に変性させ；(2)2またはそれを超える超微細位置間にDNAを前後に迅速に輸送または移動させ；および(3)限定するものではないが、制限エンドヌクレアーゼ、DNAまたはRNAポリメラーゼ、ならびにリガーゼのごときDNA修飾酵素を、デバイス上のいずれかの所望の超微細位置で選択的に濃縮するユニークな電子工学的機構が提供される。APEXデバイス上で行うことができる電子工学的に制御された分子生物学的反応および増幅反応をの例には：(1)ds-DNA配列の電子工学的に指向された制限酵素切断；(2)DNAポリメラーゼによる標的DNAの電子工学的増幅；(3)DNAおよびRNAリガーゼによる標的DNA配列の電子工学的な連結および増幅；および(4)RNAポリメラーゼによる標的DNAの電子工学的な増加が包含される。

#### III(g) 電子工学的な制限断片分析

ds-DNAの制限酵素切断を行うことに加えて、APEXデバイスおよび電子工学的技術は、DNA断片の相対的サイズを分析し測定するのに用いることができる。このことは、異なる長さのDNA断片が個々の超微細位置上の共通捕捉配列にハイブリダイズできる場合に可能である。あるいは、異なる長さのDNA断片が異なる捕捉配列にハイブリダイズできる場合、その全てが同一のハイブリ

ダイゼーションまたは結合エネルギーを有する。これらの場合には、電子工学的厳格条件を用いて、それらの非-ハイブリダイズ配列または重複配列の長さにより、異なるDNA断片を選択的に脱-ハイブリダイズさせることができる。長い重複配列を有する断片上の電気泳動力は、短い重複配列を有する断片の前にそれらを脱-ハイブリダイズさせる。かくして、断片が検出用に標識され、特異的超微細位置にアドレスされている場合には、それらを超微細位置から脱-ハイブリダイズさせるのに要する電気泳動電位または電力レベルによって、それらのサイズを測定することができる。同等の電子工学的な制限断片長の多形分析を行うことも可能であろう。

APEXデバイスの製造および適用に関する以下の無制限の実施例に参照する

ことによって、ここに本発明をさらに詳細に記載する。

以下の実施例中の緩衝液、溶液および培地の処方、ジェイ・サムブルック(J. Sambrook)、イー・エフ・フリッシュ(E. F. Fritsch)、およびティー・マニアティス(T. Maniatis)「モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」第2版、ニューヨーク、コールド・スプリング・ハーバー(Cold Spring Harbor)のコールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)社、1989年に記載されている。

#### I V. 実施例

##### 実施例1：オリゴヌクレオチドの合成および修飾

合成DNAプローブは、アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)自動DNAシンセサイザー上で、慣用的なホスホルアミダイト化学を用いて作製した。オリゴマーは、5'-アミノまたは3'-リボヌクレオシドのいずれかを含有するように設計した。5'-官能基はABIアミノリンク(Aminolink)2試薬を用いることによって導入し、3'官能基はRNA CPG支援からの合成を開始することによって導入した。3'-リボヌクレオチド末端は、第一級アミンと反応してシフ塩基を形成できる過ヨウ素酸酸化法によって末端ジアルデヒドに転化できる。

反応条件は以下の通りである：20-30°C.D.オリゴマーを水中に最終濃度10D/ $\mu$ lまで溶解する。1容量の0.1M酢酸ナトリウム、pH5.2および1容量の0.45M過ヨウ素酸ナトリウム(水に新たに調製する)を添加する。その反応物を暗所下、室温にて少なくとも2時間攪拌しインキュベートする。反応混合物を、0.1Mリン酸ナトリウム、pH7.4で平衡化したセファデックスG-10カラム(パスツール・ピペット、0.6×5.5cm)上に負荷する。200 $\mu$ 立1画分を採取し、2 $\mu$ lのアリコートを薄層クロマトグラフィー(TLC)上にスポットし、紫外線(UV)吸収画分を保存する。

以下のオリゴマーが3'-リボヌクレオチド末端(U)を含有している：

ET-12R	5'-GCT AGC CCC TGC TCA TGA GTC TCU
CP-1	5'-AAA AAA AAA AAA AAA AAU
AT-A1	5'-CTA CGT GGA CCT GGA GAG GAA GGA GAC TGC CTG U
AT-A2	5'-GAG TTC AGC AAA TTT GGA GU
AT-A3	5'-CGT AGA ACT CCT CAT CTC CU
AT-A4	5'- GTC TCC TTC CTC TCC AGU
AT-A5	5'- GAT GAG CAG TTC TAC GTG GU
AT-A6	5'- CTG GAG AAG AAG GAG ACU
AT-A7	5'- TTC CAC AGA CTT AGA TTT GAC U
AT-A8	5'- TTC CGC AGA TTT AGA AGA TU
AT-A9	5'- TGT TTG CCT GTT CTC AGA CU
AT-A10	5'- CAT CGC TGT GAC AAA ACA TU

5' アミン基を含有するオリゴマーは、一般的にテキサス・レッド(TR、590 nm励起、610 nm蛍光)のごとき蛍光団と反応する。塩化スルホニルは第一級アミンに対して非常に反応性が高く、安定なスルホンアミド結合を形成する。

テキサス・レッド-DNAコンジュゲートは以下のごとく作製する：テキサス・レッド塩化スルホニル(モレキュラー・プローブス(Molecular Probes)社)をジ

メチルホルムアミド(DMF)に溶解し、最終濃度50 mg/ml(80 mM)とした。オリゴマーを0.4 M重炭酸ナトリウム、pH 9.0-9.1に溶解して最終濃度10 D./ $\mu$ l(21 重体では5.4 mM)とした。微小試験管中で、オリゴマー10  $\mu$ lおよびテキサス・レッド20  $\mu$ lを合わせた。暗所下にて1時間反応させた。アンモニアまたはヒドロキシルアミンで反応をクエンチし、試料を凍結乾燥し、PAGEによって精製した(サンプブルック(Sambrook)ら、1989年、前掲)。

以下のオリゴマーには5'-アミノ末端が含まれている：

ET-21A	5'-Amino-TGC GAG CTG CAG TCA GAC AT
ET-10AL	5'-Amino-GAG AGA CTC ATG AGC AGG
ET-11AL	5'-Amino-CCT GCT CAT GAG TCT CTC
T-2	5'-Amino-TTT TTT TTT TTT TTT TTT T
RC-A1	5'-Amino-CAG GCA GTC TCC TTC CTC TCC AGG TCC ACG TAG
RC-A2	5'-Amino-CTC CAA ATT TGC TGA ACT C
RC-A3	5'-Amino-GGA GAT GAG GAG TTC TAC G
RC-A4	5'-Amino-CTG GAG AGG AAG GAG AC
RC-A5	5'-Amino-CCA CGT AGA ACT GCT CAT C
RC-A6	5'-Amino-GTC TCC TTC TTC TCC AG
RC-A7	5'-Amino-GTC AAA TCT AAG TCT GTG GAA
RC-A8	5'-Amino-ATC TTC TAA ATC TGC GGA A
RC-A9	5'-Amino-GTC TGA GAA CAG GCA AAC A
RC-A10	5'-Amino-ATG TTT TGT CAC AGC GAT G

## 実施例2： 微細加工した試験デバイス上の電子工学的にアドレス可能な超微細位置-ポリリジン法

超微細位置は微小毛細管(0.2 mm×5 mm)から加工した。0.1-1.0%ポリリジンを含有する18-26%ポリアクリルアミドで毛細管を満たし、重合させた。過剰な毛細管を刻みを付け、空気泡を該管内にトラップされないように除去し、管の長さを標準化した。毛細管が共通の上部緩衝液容器を分かち、個々の下部緩衝液容器を有するように毛細管をマウントした。各下部緩衝液貯蔵器には、

白金配線電極が含まれていた。

上部貯蔵器中の微細毛細管の上部表面をアドレス可能な超微細位置であると考えた。上部および下部貯蔵器を0.1 Mリン酸ナトリウム、pH 7.4で満たし、バイオラド(BioRad)500/1000電力供給機を用いて、0.05 mA一定で10分間プレー作動させた。過ヨウ素酸酸化ET-12R捕捉配列約2 μn(0.1 O.D.)を電源を入れた上部貯蔵器にピペットで添加し、一定電流で2-5分間電気泳動した。該ET-12R捕捉配列が濃縮され、超微細位置表面の第一級アミンに直ちに共有結合する。次いで、今度は試験毛細管が負に偏倚されるように極性を反対にし、さらに2-5分間電気泳動した。共有結合したDNAは超微細位



置に残るが、残存している非-結合DNA配列はいずれも弾かれた。

上部緩衝液貯蔵器を吸引し緩衝液で濯いだ。器具は分解して、新たな関係試験デバイスをマウントした。該貯蔵器を再充填し、蛍光標識した相補的DNA配列、すなわちET-10AL-TRを添加した。正に偏倚した試験超微細位置において、0.05mA定電流で2-5分間オリゴマーを電気泳動的に濃縮した。極性を反対にし、非結合相補鎖を除去した。該試験デバイスを除去し、エピ蛍光顕微鏡によって検鏡した。非-特異的結合についての負の対照は、ET-10AL-TRを非-相補的DNA配列ET-21A-TRに代えて、前記のごとく行った。

毛細管超微細位置表面の断面は、ハママツICCDカメライメージング・システム(Hamamatsu ICCD camera imaging system)を備えたジェナ(Jena)エピ蛍光顕微鏡下にて検査した。蛍光分析の結果は、相補的ET-10AL-TR配列が結合物体にハイブリダイズし/配列を捕捉し、電位を負に偏倚させた場合でさえハイブリダイズしたままであることを示した。ET-21A-TR非-相補的配列は、電位を反対にした場合には試験デバイス表面に保持されなかった。

### 実施例3： 微細加工試験デバイス上の電子工学的にアドレス可能な超微細位置-スクシンイミジルアクリル酸法

この実施例では、オリゴヌクレオチドの5'-末端に共有結合する別の付着化学を記載する。ポリリジンを1%アクリル酸スクシンイミジル(モレキュラー・プ

オーブス(Molecular Probes)社)に代える以外は前記のごとく、毛細管を加工した。第一級アミンを反応させるのに用いるスクシンイミジルエステルは相対的に、特にpH8.0を超える領域にて不安定であるため、該毛細管は新鮮に仕上げた。該毛細管を前記のごとくマウントし、貯蔵器を0.1Mリン酸ナトリウム、pH7.4で満たした。該毛細管を0.05mAにてプレ-作動させた。5'-アミノ末端を含有するET-10AL(0.1O.D.)約2 $\mu$ lを電源を点けながら上部貯蔵器にピペットで添加し、2-5分間電気泳動輸送を行った。試験デバイスが負に偏倚するように極性を反対にし、さらに2-5分間電気泳動を行った。非-結合DNAは反発したが、共有結合したDNAは超微細位置に残留した。

上部緩衝液貯蔵器を吸引し、緩衝液で濯いだ。参照試験デバイスを外し、新た

な参照デバイスをマウントした。貯蔵器を再度満たして、蛍光標識相補的オリゴマー E T-1 1 A L-T R を添加し、前記のごとく電気泳動を行った。非-特異的結合の負の対照は、E T-1 1 A L-T R を非-相補的 D N A 配列 E T-2 1 A-T R に代えて前記のごとく行った。

各試験デバイスの蛍光分析は、相補的 E T-1 1 A L-T R が捕捉配列 (E T-1 0 A L) にハイブリダイズし、極性を負に変化させた場合でさえハイブリダイズしたままであることを示した。非-相補的配列 E T-2 1 A-T R は、極性を反対にした場合には超微細位置に残存していなかった。

#### 実施例 4 : 電子工学的に制御された蛍光 D N A / 色素検出工程

エチジウムブロミド (E B) のごとき特定の色素は、二本鎖 D N A に結合した (インターカレーション) 場合に非常に蛍光性になる。二本鎖 D N A に結合した場合に蛍光性および結合親和性は大きい ; 該色素は一本鎖 D N A にも幾分親和性を有し、結合した場合に低レベル蛍光を出す。以下の例では、電子工学的に制御された D N A / 色素検出工程をいかにして開発できるかを示している。

実施例 2 および 3 に記載のごとく毛細管試験デバイスを調製し、ハイブリダイズさせた。エチジウムブロミド (E B) を緩衝溶液 (~ 0.05 mM E B 最終濃度) に添加し、試験デバイスを負に偏倚させて、ハイブリダイズおよび非ハイブリダイズした超微細位置の双方で E B (正に荷電) を濃縮した。試験デバイスは、550 nm 励起および 600 nm 蛍光にてエピ蛍光顕微鏡によって観察した。ハイブリダイズおよび非-ハイブリダイズした双方の超微細位置は、濃縮された E B から強い赤蛍光を示した。

試験デバイスを再度マウントし、0.05 mA、0.03 ボルト-時間の正の定電位に偏倚して E B を選択的に除去した。ハイブリダイズしなかった超微細位置の蛍光は減じられたが、ハイブリダイズした超微細位置は非常に高レベルの E B 蛍光を保持していた。以下のごとき結果が得られた :

捕捉	標的	標準化シグナル
ET-10AL	ET-11AL(正)	200>
ET-10AL	ET-21A(負)	1

蛍光シグナルは、ICCDイメージング・カンラシステムを用いて測定し、ピークの蛍光強度を表した。ノイズに対するシグナルの比は、全体の蛍光シグナル面積を積算した場合には1000倍を超えるであろう。このことは、ノイズに対するシグナルの比を上昇させ、インターカレーティング色素を用いたDNAアッセイの動的範囲について方法を証明している。

#### 実施例5：金属基板上の電子工学的にアドレス可能な位置

アルミニウム(Al)および金(Au)配線(0.25mm、アルドリッチ(Aldrich)社)をトルエン中の10% 3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APS)と反応させた。APS試薬は金属表面上のオキシドおよび/ヒドロキシル基と容易に反応して、オキシドおよび/またはヒドロキシル基と第一級アミンとの間に結合を形成した。アルミニウムは予め処理する必要はない。金配線を5×SSC溶液中の電解に付して酸化層を形成させた。別法として、金属配線は過塩素酸浴によって酸化することができる。

APS反応は以下のごとく行った：配線を3インチに切断し、ガラス板に置いた。トルエンを添加して該配線を完全に覆い、加熱プレート上で温度を50-60℃とした。APSを添加して最終濃度10%とした。溶液を混合し、反応を20分間続けた。豊富な容量のトルエンで3回濯ぎ、次いで豊富な容量のアルコールで3回濯いで、50℃オープン中で乾燥した。

次いで、APS処理配線は、アルデヒドを反応させてシフ塩基を形成させることができる。結合物体ET-12Rは、明細書の他の場所に記載したごとく過ヨウ素酸酸化した。電極は脱気した水の貯蔵器中に設置した。電力は、.05mA一定で約30秒供給した。活性化ET-12Rは直ちに添加した。電力を供給し、液体を吸引して新鮮な水を添加し、再度吸引した。試験(正に偏倚)および対照の電極は、蛍光標識成分DNA、ET-10-TRを含有するハイブリダイゼーシ

ヨン緩衝液(HB、 $5 \times SSC$ 、 $0.1\% SDS$ )中に設置した。2分後に電極を各1分間洗浄緩衝液( $1 \times SSC$ 、 $0.1\% SDS$ )で3回洗浄し、蛍光によって観察した(励起 $590\text{ nm}$ 、蛍光 $610\text{ nm}$ )。

結果は、ET-12Rが特異的に試験金属の表面に特異的にカップリングしたことを示している。試験電極は蛍光性であったが、対照電極はそうではなかった。金属に対するDNAの非特異的吸着はハイブリダイゼーション緩衝液中のSDSが存在することによって阻害された。電解による金基板への付着および続くAPS処理が有効であった。得られたシグナルは、非-酸化金で観察したものよりも顕著に強かった。さらに重要なことには、この実施例では、金属表面を結合物体で化学的に官能基付加し、かつ誘導化することができ、溶液から絶縁されることないことが示された。APS法は、DNA-金属コンジュゲートを形成させる多くの利用可能な化学のうちの1種を表している。

#### 実施例6： 電子工学的に制御された蛍光色素検出工程-金属配線

DNA-アルミニウム電極基板を調製し実施例5に記載のごとくハイブリダイズさせた。対照として、ハイブリダイズしたおよびハイブリダイズしなかったDNA-Al電極を非誘導化Al配線で処理した。エチジウムブロマイド(EB)を添加し、その溶液および試験DNA電極を負に偏倚させて色素を誘引した。その

溶液を吸引し、新たな緩衝液を添加した。金属表面を顕微鏡下で検鏡した。

デバイスを再マウントし、所定の電圧一時間、正の電位を供給する。緩衝液を吸引し、エピ蛍光によって電極を観察した。このことは、ハイブリダイズしたおよびハイブリダイズしなかった金属表面の間の蛍光に有意な差が生じるまで繰り返した。

捕捉	標的	標準化シグナル
ET-12R	ET-10AL(正)	>140
ET-12R	なし(負)	1

ハイブリダイズしなかった金属表面の蛍光性は減じたが、ハイブリダイズした金属表面は蛍光性を保持していた。蛍光シグナルは、ICCDカメラ・イメージ

ングシステムを用いて測定し、ピークの蛍光強度を表した。全体の蛍光シグナル面積を積算した場合には、ノイズに対するシグナルの比は $\gg 1000$ 倍となるであろう。この実施例では、この方法が、ノイズに対するシグナル比を上昇すること、それ故にアッセイの範囲が動的であることを示している。同様な結果が毛細管ゲル立体構造を用いても得られるということは、電気化学効果がアッセイの性能に顕著に影響しないことを示している。

**実施例7： 能動的プログラム可能な電子工学的マトリックス(APEX)-マイクロマシニング加工**

6個のアドレス可能な $250\mu\text{m}$ 毛細管位置の放射状配列は、プラスチック基板から微細加工した。該デバイスは、共通の上部貯蔵器と、各超微細位置を個々にアドレス可能なように分離した下部貯蔵器を有している。ユニークなオリゴマー配列結合物体は、前記した方法によって高度に架橋したポリアクリルアミドから製作した特異的超微細位置に位置させ、結合している。試験超微細位置は正の電荷を有しているが、他の位置は非-特異的相互作用を防ぐために負の電位を有している。

該配列は洗浄し、次いで相補的な蛍光標識したDNAプローブとハイブリダイズさせる。該配列を洗浄して過剰なプローブを除去し、次いでエピ蛍光顕微鏡下で観察した。特異的にアドレスした超微細位置のみが蛍光性であった。この工程は、他の1箇所にて他の結合物体で繰り返し、他の蛍光基で標識したプローブとのハイブリダイゼーションによって確認する。

DNA配列は、他の位置との無視してよい架橋で所定の位置に特異的に設置された。このことによって、数個～数百個のユニークな配列を有するマイクロマトリックスを所定の位置に加工することができる。

低バックグラウンドの適当なプラスチック基板を選択するために、それらの600nmにおける蛍光特性について、異なる基板を試験した。プラスチックは、エピ蛍光顕微鏡イメージングシステムおよびフルオロメーターによって試験した。基板のリストおよびLS50Bフルオロメーターから得た蛍光判読値を以下の表に記載する：

プラスチック基板	610nmにて 5秒間の強度
ABS 黒色	0.140
白色	6.811
ポリスチレン	7.955
アクリル樹脂 透明	0.169
白色	51.77
薄い色	0.151
黒色	0.035
トランスホワイト	51.22
UHMW 黒色	0.743
白色	
デルリン 黒色	1.834
白色	61.39
TFE	96.05

ポリプロピレン 白色	22.18
自然色	25.82
ポリカーボネート 透明	11.32
薄い色	3.103
白色	45.31
黒色	0.156
PVC 灰色	2.667

本実験は、黒色アクリル、ABSおよびポリカーボネートが最も低いバックグラウンドレベルを有することを示している。

#### 実施例8： 能動的でプログラム可能な電子工学的マトリックス(APEX)-マイクロリソグラフィ加工

シリコン・ウェハー上の8×8のマトリックス(64部位)の50μm四方微細位置(図3参照)を設計し、加工し、スイッチ・ボックスと共にパッケージングした(詳細についてはデバイス加工セクション参照)。いかに記載する数種の材料および工程の改良を行って、APEX DNAチップデバイスの感度および能動性を

向上させた。

#### 8 a) 最上層コートを選択

A P S (3-アミノプロピルトリエトキシシラン)工程には、チップの全表面を反応させることが含まれる。この初期機能化工程の感度は、チップ表面上の種々の物質の相対反応性に依存する。超微細位置を囲む領域への官能基化および二次DNA付着を減少させるためにS i O<sub>2</sub>または金属酸化物よりも反応性の低い材料が必要である。フォトレジストおよび窒化ケイ素を試験した。異なった最上層コートを窒化ケイ素チップに付した。該チップは、エピ蛍光によって検査し、次いでA P Sで処理した後、過ヨウ素酸酸化ポリ-A R N A配列(シグマ(Sigma)社、分子量100,000)を共有結合させた。該チップは、ハイブリダイゼーション緩衝液中のテキサスレッド標識20重体(T2-TR)の200 nM溶液と37℃にて5分間反応させた。そのチップは洗浄緩衝液中で3回、1×SSC中で1

回洗浄した。そのチップを590 nm励起および610 nm蛍光の蛍光性によって検査した。

二酸化ケイ素に比してA P Sに対し非常に低い反応性、およびフォトレジスト材料のように本来は蛍光性でないため、窒化ケイ素を選択した。また、バックグラウンド面積のUV焼損のごとき他の方法を可能である。

#### 8 b) A P E Xの物理学的特性

仕上げたマトリックスチップは、バイ・アンド・エル顕微鏡およびCCDカメラを付けたプローブ・テスト・ステーション(Probe Test Station)(マイクロマニピュレーター・モデル6000)を用いて目視検査した。試験パッドおよび外部接触パッドの間の連続性につき、チップを試験した。これは、パッドと、マルチメーターに連結したマニピュレーター・プローブ・チップとを接触させることにより行った。連続性によって、該パッドが金属表面にエッチングされていることが確認された。次いで、電子工学的環境下での安定性についてパッドをチェックした。金属配線は、通常の乾燥条件下では1 mAまで扱えると評価された。

1 滴(1-5  $\mu$ l)の緩衝化溶液(1  $\times$  SSC)を8  $\times$  8マトリックスにピペットで添加した。表面張力によって液体は、外部接触パッド領域を乾燥させつつ同じ場所に維持される。1 個のプロブ・チップを接触パッドに接触させ、もう1 個のプロブ・パッドを液体と接触させた。HP 6625 A 電力供給機およびHP 3458 A デジタルマルチメーターを用いて最大電圧50 Vにて、電流を50 nAまで段階的に上昇させた。

第一の加工は、ケイ素基板、二酸化ケイ素絶縁層、アルミニウム沈着およびパターニング、ならびに窒化ケイ素最上層よりなる。

第二の加工工程には、アルミニウム金属および窒化ケイ素の層の間の二酸化ケイ素層が含まれる。二酸化ケイ素およびAlは、より和合性の物理特性を有し、より良好な化学インターフェースを形成して、第一の加工工程によって製作したものよりも、より安定かつ丈夫なチップを提供する。

#### 8(c) DNA付着

8  $\times$  8のマトリックス・チップを、実施例5記載のAPS試薬で機能化した。次いで、そのチップを過ヨウ素酸酸化ポリ-ARNA(シグマ(Sigma)社、平均分子量100,000)で処理した。チップを洗浄緩衝液(WB)中で洗浄して過剰なおよび結合しなかったRNAを除去した。この工程によって、捕捉配列によりチップ全体がコートされるが、窒化物でカバーした領域よりも暴露した金属表面に非常に高い密度が存在した。そのチップを、ハイブリダイゼーション緩衝液(HB)中のT2-TRの200 nM溶液と37  $^{\circ}$ Cにて5分間ハイブリダイズさせた。次いで、WB中にて3回、1  $\times$  SSC中にて1回、各々常温で1分間洗浄した。チップは、590 nm励起および610 nm蛍光の蛍光性によって検査した。

広げられた金属領域は蛍光に光り、50  $\mu$ m四方のパッド(超微細位置)の形状を有していた。低い蛍光強度および/または不定形の境界は、幾つかのパッドが完全に広がっていなかったことを示した。このような場合には、プラズマエッチングをさらに数回行うことが推奨されるであろう。

#### 8(d) 電子工学的に制御されたハイブリダイゼーション

能動的ハイブリダイゼーションは、実施例8cからのチップを用い、1 個の特



異的超微細位置を正に偏倚させることによって行った。これは、残存した超微細位置を負に自動的に偏倚もするスイッチ・ボックスを用いるか、外部溶液有の電極を用いることによって行う。3  $\mu$ lの緩衝液をマトリックス・パッド(超微細位置)上のみに置いた。～1-5 nAの電流を数秒間流し、0.1ピコモルのT2-T Rを該溶液に添加した。液体を除去し、チップを乾燥して、590 nm励起および610 nm蛍光のテキサス・レッド蛍光性について検査した。正に偏倚した特異的超微細位置のみが蛍光性であった。APEXチップ上の他の特異的超微細位置を用いて、この実験を数回繰り返した。加えて、1個の超微細位置の蛍光性DNAを電子工学的に脱-ハイブリダイズさせ、次いで、最初の位置を負に、かつ目的の超微細位置を正に偏倚させることによって、もう1個の超微細位置に移動させた。

#### 8 e) 電子工学的に制御するアドレッシングおよびデバイスの加工

8×8 APEXマトリックスを、前記のごとくAPSで機能化した。オリゴヌクレオチド結合物体CP-1は、過ヨウ素酸酸化法によって活性化した。4つの超微細位置をマトリックス内で正に偏倚させ、残存するものを負に偏倚させた。緩衝液2  $\mu$ lをマトリックスに置き、電流を流した。結合物体CP-1を添加し、示した位置に電子工学的に濃縮した。液体を除去し、該チップを緩衝液で簡単に洗浄し、緩衝液2  $\mu$ lを該チップ上に置いた。再度、電流を数秒間流し、T2-T R 2ピコモルを添加した。短時間の後に、液体を除去して該チップ全体をWBで3回洗浄した。チップを乾燥し蛍光性について検査した。

結果は、4個の正に偏倚した超微細位置は全て蛍光性であることを示している。この実施例は、特異的結合物体での超微細位置の選択的なアドレッシング、付着配列の微細位置への位置付けおよび共有結合、ならびに相補的標的配列の誘導化超微細位置への特異的ハイブリダイゼーションを示す。

#### 8 f) APEXチップの遺伝的タイピング

多形性のHLA遺伝子dQaに特異的な3'-リボヌクレオシド末端を有するDNA結合物体を合成した。該結合物体は、前記のごとき過ヨウ素酸酸化によって活性化した。反対の相補性物は、前記のごとく、5'-アミノ末端で合成し、テキ

サス・レッド、ローダミンまたはボジピー色素のごとき蛍光団とコンジュゲートさせた。超微細位置は、前記のごとく、A P S で処理することによって第一級アミンで機能化する。

、数 $\mu$ lの溶液を8×8マトリックス上に置いた。特異的超微細位置は、超微細位置を正に偏倚させることによってアドレスし、～0.1ピコモルの過ヨウ素酸化DNAオリゴマーを添加し、その位置に移動させ共有結合させた。極性を反転させ、結合しなかった結合物体分子を除去した。これは、全てのユニーク付着結合物体がチップに結合するまで、他のアドレスされた超微細位置の他の結合物体について繰り返す。次いで、チップを個々の蛍光標識相補的配列にハイブリダ

イズさせて、カップリング反応の特異性を決定すると同時に、全てのアドレスされた超微細位置を視覚化した。電子工学的に変性させて相補的オリゴマーを除去した(0.05% SDS中、90℃にて10分間)同一のチップ上にて、アドレスした超微細位置が非標識標的DNAまたはゲノムDNAと共にハイブリダイズする。検出は、明細書に前記したごとく、蛍光色素検出アッセイを介した。

超微細位置がユニークな結合物体と共に特異的にアドレスされたことを結果は示すであろう。負に偏倚させた超微細位置への非特異的結合は、無視できるであろう。該デバイスおよび連結した結合物体化学は、変性条件下でも安定であり、それ故にアドレスされ加工されたデバイスは再利用することができる。ハイブリッドを変性させる電子工学的方法は、電流を上昇させおよび/またはそれを流す時間を増加させるであろう。

#### 実施例9： 電子工学的厳格制御

##### 9A) 15重体Ras-12プローブでの単一点突然変異

高レベルの電子工学的厳格制御に影響するデバイスの能力は、15重体プローブを用いたRas-12オンコジーン・モデル系で証明した。DNA二本鎖における単一の塩基対の誤対合は、対合した二本鎖に比して僅かな不安定性しかハイブリッド対に生じない。この僅かな不安定性が、誤対合二本鎖を引き起こして、対合した二本鎖よりも僅かに低い $T_m$ で変性させる。該対(対合および誤対合)が両方とも対合した対に対して最適な厳格でハイブリダイズする場合、誤対合した

対はより低い効率でしかハイブリダイズしないであろう。誤対合からのハイブリダイゼーション・シグナルは、対合した対からのシグナルよりも幾分低いであろう。従来のハイブリダイゼーション法では、単一の点突然変異分析は、8重体～21重体範囲のプロープで行う。10重体～20重体範囲のプロープが最も頻繁に用いられる。突然変異プロープが8重体よりも短いか、20重体よりも長い場合、いずれの信頼できる方法を用いても、誤対合から対合したものを識別することは極めて困難となる。これは、対合および誤対合した対の間のハイブリダイゼーション・シグナルにほとんど差異がないためである。点突然変異分析で使用

するハイブリダイゼーション・厳格制御の典型的な方法は、温度および塩濃度をあてにしている。本発明者らは、厳格制御が電気泳動電位によっても影響されるということを見い出した。

Ras-12の例において、15重体点突然変異特異的プロープを試験デバイス上の超微細位置に付着した30重体標的配列に電子工学的にハイブリダイズさせた。超微細位置の極性を負に偏倚させ、完全に対合したものには影響せずに誤対合したものを変性させる所定の電力レベルを供する一定電流に所定の時間該ハイブリッドを付した。

以下の配列を、各々250 μm表面超微細位置を有する3セットの試験構造上で合成し試験した。

付着配列は：

Ras-G      5'-GGT GGT GGG CGC CGG CGG TGT GGG CAA GAU-3'-  
超微細位置

である。

レポーター・プロープ配列(テキサス・レッドで標識)は：

Ras-1      3'-CC-GCG-GCC-GCC-ACA-C-5'-(TR)  
Ras-2      3'-CC-GCG-GCA-GCC-ACA-C-5'-(TR)  
Ras-3      3'-CC-GTG-GCA-GCC-ACA-C-5'-(TR)

である。

デバイスは、明細書に前記したごとく、毛細管から加工した。付着配列Ras

-GおよびR a s-Tを過ヨウ素酸酸化し、アドレスされた超微細位置に共有結合させた。

次いで、R a s-G超微細位置をR a s-1、R a s-2またはR a s-3とハイブリダイズさせた。R a s-1はR a s-Gに完全に対合した。R a s-2は1塩

基対が誤対合である(G-A)。R a s-3は2塩基対誤対合である(G-AおよびG-T)。G-A誤対合はDNA二本鎖に対して最も低い不安定性しか生じず、それ故、完全な対合から識別することが最も困難である。

慣用的なハイブリダイゼーションを最初に行って超微細位置を蛍光的に検査し、どのくらいの範囲の相補的配列がハイブリダイズしているのかを測定した。試験デバイス(微細毛細管)を再マウントし、次いで電子工学的ハイブリダイゼーションを行った。完全に対合したハイブリッドに大きな影響を及ぼすことなく誤対合したハイブリッドが完全に除去されるまで、負の電位(一定電流)でそれらを偏倚させることによって同一の電子工学的厳格に試験デバイスを全て付した。方法および結果を以下に示す：

#### 従来のハイブリダイゼーション法：

- 40℃にて15分間5×SSC中でハイブリダイズさせ、
- 各々20℃にて5分間、1×SSC中で3回洗浄し、
- 蛍光分析を行い、
- 1bp誤対合(R a s-G/R a s-2)に対する完全対合(R a s-G/R a s-1)のシグナル比を観察する：約10対1。

#### 電子工学的厳格制御(ESC)法：

- 20℃にて5分間、5×SSC中でハイブリダイズさせ、
- 「洗浄工程なし」
- 150ボルト(V)にて0.15ミリアンペア(mA)の電子工学的厳格を4分間(20℃)適用し、
- 蛍光分析を行い、
- 1bp誤対合(R a s-G/R a s-2)に対する完全対合(R a s-G/R a s-1)のシグナル比を観察する：>100対1

全実験についての完全な結果を図(15)にグラフ的に示す。これらの結果は、DNAハイブリダイゼーション反応における厳格制御には電気泳動電位のみしか

使用できないことを示している；しかし、ESCによって、従来のハイブリダイゼーション法よりも高いハイブリダイゼーション効率および高い識別比が供されることも示している。加えて、ESCは各個々の超微細位置に適用することができ、同一のバルク溶液中で独立した厳格制御が供される。

#### (9B) 7重体および22重体プローブを用いた単一点突然変異分析

点突然変異分析で通常用いる正常なサイズ範囲とはかけ離れた7重体および22重体の両方のプローブを調製し、さらに電子工学的ハイブリダイゼーションおよびESCの利点を証明した。以下に掲載する点突然変異特異的オリゴマー・プローブは、得られるハイブリッドが0、1または2塩基の誤対合を有するように対形成させることができる。前記のごとく、相補的オリゴマー配列を超微細位置にカップリングさせ、ハイブリダイズさせた。超微細位置で極性を反転させ(負に偏倚)、そのハイブリッドを、完全対合を除去することなく誤対合を変性させる所定の電力レベルを供する一定電流に所定の時間付した。

Ras-GまたはRas-GAオリゴマー(以下に示す)が超微細位置の付着し、これらを標的配列として用いた。以下に示す22重体および7重体のRas特異的オリゴマーのシリーズを、本明細書のいずこかに記載したごとく、テキサス・レッド発蛍光団で標識した。「下線を引いた塩基および太字の塩基」は、誤-対合および/または誤-対合する可能性のある位置を示している：

Ras-G	5'-GGT GGT GGG <u>CGC</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> TGT GGG CAA GAU
Ras-GA	5'-Amino-GGT GGT GGG <u>CGC</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> TGT GGG CAA GA
Ras-22C-TR	(TR)-5'-TGC CCA CAC <u>CGC</u> CGG CGC CCA C
Ras-22A-TR	(TR)-5'-TGC CCA CAC <u>CGA</u> CGG CGC CCA C
Ras-TA	(TR)-5'-TGC CCA CAC <u>CGA</u> CGG <u>TGC</u> CCA C
Ras-7C	(TR)-5'-ACA <u>CCG</u> C
Ras-7A	(TR)-5'-ACA <u>ACG</u> C

試験デバイスは、本明細書中にて前記したごとく、毛細管から加工した。オリゴマー標的Ras-GまたはRas-GAは、超微細位置に共有結合した。次いで

、1個の超微細位置を、テキサス・レッドで標識した完全な22重体の相補的 Ras-22C-TR とハイブリダイズさせた。第二の超微細位置は、1塩基対が誤対合している(G-A)22重体である Ras-22A-TR ; または、2塩基が誤対合している(G-AおよびG-T)22重体である Ras-22-TA とハイブリダイズした。

本明細書において前記した試験デバイスは、両方の超微細位置が同一の電流または電力レベルを同時に経験する二重チャンネル様式で同時に作動させた。試験デバイスを最初に従来法によってハイブリダイズさせ、超微細位置を蛍光的に検査してハイブリダイズした相補的配列の量を測定した。対で、試験デバイスを用いて電子工学的ハイブリダイゼーションを行い、完全対合ハイブリッドには大きく影響を及ぼさずに誤対合ハイブリッドが除去されるまで、一定電流で時間を制御した。バイオーラド(Bio-Rad)1000/500電力供給機は、典型的には、0.02~0.1mAに設定し、0.02~0.04ボルト-時間で一定電流で実験を行った。デバイスを分離し、ケイ素強化CADカメラ(ハママツ(Hamamatsu)社)を付けたジェナ(Jena)顕微鏡上でエピ蛍光によって試験デバイスを観察した。そのイメージをハママツ・アーガス10イメージ・プロセッサー(Hamamatsu 10 image processor)によって加工し、ソニー・ビデオプリンター(Sony Video Printer)によって記録した。さらなる電子工学的厳格を要する場合には、該毛細管を再作動させた。

単一の塩基対誤対合の識別は、前記のごとく7重体で行った。しかしながら、その低T<sub>m</sub>により、室温よりもむしろ4-6℃の冷却ボックス中でデバイスを作動させた。

電子工学的ハイブリダイゼーションおよび厳格制御が、7重体および22重体の両方を用いた単一の塩基対誤対合を識別できることを結果は示した。対合：誤対合比は100：1またはそれよりも大きかった。このシグナル：ノイズ比は、温度およびイオン濃度を用いて厳格条件を制御するいずれかのハイブリダイゼー

ション法によって報告されたものよりも一般的に良好であった。

たとえ、二本鎖を安定化できるAとの水素結合にGのイミノのプロトンが参加

することができるためにG-A誤対合が最も安定な誤対合であっても、電子工学的厳格制御は、完全対合から1塩基G-Aの誤対合を識別することができた。

電力の消費計算値および測定値は、温度においては無視できる変化しか示さず、厳格は超微細位置での温度変化によって引き起こされないことが証明された。前記のごとき受動的にハイブリダイズする超微細位置が対合および誤対合の間の識別を示さなかったことは、拡散性が識別を引き起こさないことを証明している。

また、これらの例は、各微細位置が個々の厳格制御を有することができ、従って単一の普通の厳格レベルに限定される大スケールの複合ハイブリダイゼーション技術に対する主要な障害を克服できる。また、電子工学的な厳格電力レベルを熱的融点( $T_m$ )データと関連付けて、予想電気融点( $E_m$ )曲線および等式を作成することもできる。

#### (9C) 高いゲノム・バックグラウンドにおける電子工学的ハイブリダイゼーション

実施例の標的DNA配列は、通常はゲノムDNA試料中の非常に小さい比率の総DNAのみからなる。APEX・デバイス上の非常に小さな位置で総DNAを濃縮することによって、本発明は、過剰なヘテロDNAの存在下にて標的ハイブリダイゼーションの効率を向上させる。

この例において、5'-アミン基を載せている付着配列を、22%PAGE、1%アクリル酸スクシンイミジルを含有する試験デバイスに付着させた。毛細管は、ET-23ALまたはET-11AL捕捉配列のいずれかで誘導化した。標的プローブET-12Rはテキサス・レッドで標識した。ET-12R-TRは、各々試験および対照の配列である、ET-23ALにはハイブリダイズするであろうが、ET-11AL捕捉配列にはハイブリダイズしないであろう。

ヘテロゲノムDNA、子ウシ胸腺DNA(CTDNA、シグマ(Sigma)社)を溶解して最終濃度1mg/mlの水とし、超音波処理し加熱して該DNAを変性さ

せた。試料は、0、0.1  $\mu$ gまたは1.0  $\mu$ gの変性CTDNAと共に $10^{10}$ コピーのET-12R-TR標的を含有する最終容量100  $\mu$ lの0.5×TBE中に

調製した。これは、標的DNAに比して0、1,000または10,000倍の過剰なCTDNAを表していた。

試験デバイスは、バイオーラド(Bio-Rad)1000/500電力供給機を用いて $0.5 \times TBE$ 中、 $0.03\text{mA}$ にて5分間プレ-作動させた。試験および対照の毛細管が厳密に同一条件下で同時に作動できるよう試験デバイスを設定した。試料を付し( $100\mu\text{l}$ )、毛細管を $0.03\text{mA}$ にて5分間、正の電位に偏倚させてDNAを誘引した。極性を反転させ、同一の電力を流してハイブリダイズしなかった全てのET-12R-TR標的を試験デバイス表面から除去した。緩衝液を吸引し、ケイ素強化CADカメラを付けたジェナ顕微鏡(ハママツ(Hamamatsu)社)上で蛍光性によって試験デバイスを観察した。イメージは、ハママツ・アーガス10イメージ・プロセッサを用いて加工し、ソニー・ビデオ・プリンターによって記録した。

$100\mu\text{l}$ 当たり $0.1\mu\text{g}$  CT DNAの存在または不存在における絶対ハイブリダイゼーションシグナルおよびシグナル/ノイズ比の間には差異がなかった。シグナル強度は同等であり、シグナルは有効領域にわたって均等に分布していた。

$100\mu\text{l}$ 当たり $1\mu\text{g}$ のCT DNAのレベルで、シグナルが毛細管の周辺に優先して分布しているということは、捕捉配列がブロッキングまたは飽和していることを示している。この人工物は、ハイブリダイゼーション工程の間に極性を振動させることによって容易に切り抜けられた。このことによって、総DNAが有効領域に向けて、またはそこからパルスされ、より効率的かつ均等に標的をハイブリダイズさせることができるであろう。

#### (9D) 受動ハイブリダイゼーション-対-電子工学的制御ハイブリダイゼーション

電子工学的制御ハイブリダイゼーションは、受動ハイブリダイゼーションよりもより効率が良く迅速である。なぜならば、電子工学的制御ハイブリダイゼーション

における電気効果のためである。



毛細管試験デバイスは、各々試験および対照デバイスとして、E T-23 A L およびE T-11 A L 付着配列で仕上げた。C T D N A  $1\ \mu\text{g}$  と共に  $1 \times 10^{10}$  コピーのE T-12 R-T Rを含有する総容量  $100\ \mu\text{l}$  のハイブリダイゼーション溶液を作製した。

受動ハイブリダイゼーション：

1 セットの試験および対照デバイスを、 $50^\circ\text{C}$  のハイブリダイゼーション溶液  $100\ \mu\text{l}$  を入れた小さな試験管に置き、15分間ハイブリダイズさせた。次いで、試料を  $1 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$  で3回、各  $45^\circ\text{C}$  にて5分間洗浄した。

電子工学的制御ハイブリダイゼーション：

試験デバイスをマウントし、 $0.06\ \text{mA}$  にて5分間プレ-作動させた。次いで、緩衝液を吸引し、ハイブリダイゼーション溶液  $100\ \mu\text{l}$  を添加した。試験デバイスは、 $0.06\ \text{mA}$  にて3分間正に偏倚させ、次いて30秒間極性を反転させ、当該デバイスが再度正になるよう3分間再度反転させた。試験デバイスは3分間負に偏倚させて電子工学的に洗浄した。

ハイブリダイゼーションの効率および程度は、受動形式よりも能動形式の方が非常に良好であった。能動(電気)形式における絶対シグナルは、受動形式におけるシグナルよりも100倍を超えて高かった。能動形式におけるシグナル/ノイズ比は、受動形式におけるシグナルよりも10倍上昇した。能動的ハイブリダイゼーション・アッセイは、最小限の操作で10分以下で完了する。受動形式は、 $\sim 30$ 分間管および緩衝液の数種の操作を要する。

典型的なハイブリダイゼーション法では、90%の反応完了には、3回のC. t で  $2.5\ \text{nM}$  のプローブを15分間用いる。本発明者らの  $0.17\ \text{nM}$  のプローブの実験濃度は、受動ハイブリダイゼーション反応動力学では普通 $\sim 4$ 時間を要するであろう。

能動的ハイブリダイゼーションによって、低バックグラウンドとなる低プローブ濃度で 사용할 ことができる。典型的な方法は、拡散性に依存しており、従ってより高濃度を用いて反応動力学を動かさなければならない。能動的な方法によって、試料を非常に少量に濃縮することができ、このことは非常に局所的なプロ

ープ濃度となり、続いて非常に迅速なハイブリダイゼーション反応動力学とすることができる。

#### 実施例10： 蛍光DNAナノ構造でのハイブリダイゼーション

通常、非-増幅型のハイブリダイゼーション・アッセイの全体の感度は、非特異的結合からのバックグラウンドによって制限される。このことは、複数のレポーター基または複数のレポーター基との二次複合体を用いてDNAプローブを標識する場合には、しばしば主要な問題である。従って、しばしば、レポーター標識(群)の実際または固有の検出限界が到達するよりもかなり低い所までしかアッセイ検出限界が到達しない。

電子工学的制御ハイブリダイゼーション法を用いることによって、本発明者らは、非常に蛍光性の強いサブ-ミクロンまたはナノスケールのビーズを、付着DNAプローブと共に超高感度アッセイに用いることを見い出した。本発明者らは、自由フィールド電気泳動を用いて、DNAプローブ-蛍光性ナノ構造物の運動を制御することができた。電子工学的厳格制御によってハイブリダイズしなかった構造からハイブリダイズしたものを高いレベルで識別できるため、DNAプローブ-蛍光性ナノ構造物は顕著にハイブリダイゼーション感度を上昇することができる。電子工学的厳格制御によって、本発明者らは、増幅する必要なしに、これらの高い蛍光性のナノ構造物または他の複数の標識モデルを低コピー数(50～1000標的)で検出できる。現在に至るまで、このことは、従来のハイブリダイゼーション法および工程では不可能であった。

蛍光性のナノ粒子、フルオロフォアは、モレキュラー・プローブズ・インコーポレイテッド(Molecular Probes, Inc.)社から購入した。該粒子は、テキサス・レッドまたはフルオレセインのごとき蛍光性色素を載せたカルボキシメチル・ラテックススフェアおりなる。該ラテックス・スフェアは、アミンまたはアルデヒ

ドのごときその表面の異なる官能基で得ることができる。該粒子は、直径0.01～5  $\mu\text{m}$ のサイズで利用できる。

##### 1) 蛍光性ナノ粒子の特徴付け

非修飾、アミン修飾またはアルデヒド修飾されたナノ粒子は、正味正の電荷を

有している。電界においては、これらの粒子は負に偏倚させた超微細位置に向けて移動する。

## 2) フルオロスフェアへのDNA付着化学

アミン修飾中止は、末端アルデヒド基を有する核酸にカップリングすることができる。次いで本明細書中において前記した過ヨウ素酸法によって酸化される3'-末端リボシドでDNAプローブを合成することによって生成させることができる。

粒子は、蒸留水中の2%懸濁液として保存した。0.02-1.0  $\mu\text{m}$ のアミン修飾赤色蛍光性のフルオロフォアのアリコットを、0.1 Mリン酸ナトリウム、pH 7.4 中にピペット添加し、再懸濁した。過剰量の過ヨウ素酸酸化ポリリボ-Aをその懸濁液に添加した。室温にて反応させて、90分間インキュベートした。1×SSC、0.1% SDS (0.15 mM、塩化ナトリウム、0.015 mMクエン酸ナトリウム、0.1% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム、pH 7.0) 中で該粒子を洗浄しピペット添加して、結合しなかったおよび非特異的に結合したポリリボ-Aを除去した。

緩衝溶液中のDNA-フルオロスフェアを直流電界に置いた。該DNA-フルオロスフェアが正電極に向かって移動することが観察され、これは今やその正味の電荷が負に変化していることを示している。これは、DNAカップリング反応が成功したかを決定するのに単純かつ簡便な方法である。粒子からの強烈な蛍光性がいずれかのハイブリダイゼーションシグナルによって妨害されるであろうため、伝統的なハイブリダイゼーション法では、放射性同位体標識レポーター・プローブを用いることが必要であろう。

## 3) 試験デバイスへのDNA付着

試験デバイスは、続いて5'-アミン末端化DNAプローブと反応させることができる、1%アクリル酸スクシンイミジルを含有する高度に架橋したポリアクリルアミドで重合させた。捕捉配列、オリゴ-Tの付着性は、蛍光標識した相補的プローブ、CP-1-TRとのハイブリダイゼーションによって証明した。試験デバイス表面は非常に蛍光性であり、このことは該表面が捕捉配列で誘導体化され

たことを示している。

#### 4) DNA-フルオロスフェアの電子工学的ハイブリダイゼーションおよび検出

ハイブリダイゼーション反応は、共通の上部貯蔵器および独立の下部貯蔵器を分かち合っており、有する2つの毛細管試験デバイスを支持する構造中で行った。反応性の表面を共通の上部貯蔵器に暴露した。

試験デバイスを該構造にマウントし、0.05 mAの0.5 × TBE中で15分間プレ-作動させた。1つの試験デバイスはT2相補的付着配列を有しており、もう1つはET-10AL非-相補的付着配列を有している。DNA-フルオロスフェア1 μlを上部貯蔵器に添加した。試験デバイスを0.02 mAで正に5分間偏倚させ、DNA-フルオロスフェア(蛍光性のナノ粒子)を誘引させた。該粒子が表面上に存在することを確認するために該試験デバイスを精査した。試験デバイスが今度は負に偏倚され、ハイブリダイズしなかったDNA-フルオロスフェアが弾かれるように極性を反転させた。

試験および対照デバイスの間に差異はなかった。該粒子は、流した電力量にも拘わらず、繰り返し試みた後でも除去することができなかった。

#### 5) DNA-フルオロスフェアの受動ハイブリダイゼーションおよび検出

いずれの理論および仮定にもとらわれずに、本発明者らは、粒子の電子工学的ハイブリダイゼーションが、試験デバイスの表面ゲルマトリックス中の粒子を固定または捕捉すると考えた。かくして、ゲル表面上の付着性配列に受動的にハイブリダイズするDNA-フルオロスフェアは、電子工学的な脱-ハイブリダイゼーションによってより容易に除去されなければならない。

新しい試験デバイスを前記のごとくマウントした。DNA-フルオロスフェアの0.05%懸濁液を上部貯蔵器にピペット添加し、5分間受動的にハイブリダ

イズさせた。その緩衝液を吸引し、新たな1 × TBE緩衝液を添加した。今度は試験デバイスを負に偏倚させて粒子を弾いた。試験デバイスは、0.02 mAにて5分間操作し、次いで蛍光によって検査した。

今度は、室温にて合計10分間ECSを行った後の試験および対照のデバイス

の間に顕著な識別性があった。シグナルは試験表面にわたって均一に分布していなかったが、単一のポケットに濃縮された。このことは、表面付着性配列の有効性が制限されることを示しているのかもしれない。疎水性、親水性または混合された特性を有するより長いスペーサー・アームを用いて改善できる。かかるスペーサーは、例えば、ジアミノヘキサン、無水ケイ皮酸、ならびに当該分野でよく知られている種々の他のスペーサー基を用いて作製することができる。

**実施例 11： 特異的 ds-DNA 配列の電子工学的な指向性制限酵素切断**

2つの例を用いて、APEXデバイスがds-DNA配列の制限エンドヌクレアーゼ切断を選択的に行うことができる能力を証明する。M13mp18(XbaI制限部位を有する)およびM13mp8(XbaI制限部位を有していない)ベクターをこれらの実施例に用いた。これらのベクターは多くのクローニングおよびDNA配列決定工程に普通に用いられている。

第1の例では：(1)試験デバイス上の特異的微細位置に対するM13mp配列の電子工学的ハイブリダイゼーション、(2)微細位置へのXbaI制限酵素の自由フィールド電気泳動輸送、および(3)他の微細位置における切断断片の二次捕捉を証明する。該例では、特異的結合物体(オリゴヌクレオチド捕捉配列、他)で自己アSEMBル可能な該デバイスの能力も証明する。

方法における基本工程を図(16)に示す。オリゴヌクレオチド捕捉配列に共有結合する4つの特異的超微細位置(ML-1、ML-2、ML-3およびML-4)を用いた。試薬(オリゴヌクレオチド、制限酵素、他)をデリバリーするため、および反応物进行处理するためには、電子工学的デリバリーシステムを用いる。

第一の工程には、M13-1オリゴヌクレオチド捕捉配列のML-1およびML-2微細位置までの輸送およびそこへの共有結合、ならびにM13-2オリゴ

ヌクレオチド捕捉配列のML-3およびML-4微細位置への輸送および付着が含まれる。核酸は $\text{pH} > 4$ で負に荷電しているため、 $\text{pH} 5-9$ の範囲の緩衝溶液中で電気泳動した場合、それらは常に正に荷電した電極に向かって動く。

第二の工程には、ML-1超微細位置におけるM13mp18配列のM13-1捕捉配列への、ならびにML-2微細位置におけるM13mp8配列の該M13-

1 配列への自由フィールド電気泳動輸送およびハイブリダイゼーションが含まれる。

第三の工程には、XbaI制限酵素もML-I(M13mp18)超微細位置およびML-2(M13mp8)超微細位置への輸送が含まれる。XbaIはML-1のM13mp18を切断するが、ML-2のM13mp8は切断しない。ML-1からの切断断片は、ML-3のM13-2配列に輸送され、それにハイブリダイズする。実験の制御としては、ML-2およびML-4の間で自由フィールド電気泳動を行った。ML-2のM13mp8配列は切断されていないため、ML-4では断片が全く検出されない。

本実施例で用いた種々のM13付着配列およびプローブ配列は、本明細書中において前記したごとく調製する。これらの配列を以下に示す：

```

M13-C1      5'-CCA GTC ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG U

M13-C2      5'-GTA ATC ATG GTC ATA GCT GTT TCC TGT GTG U

MP18-40C    5'-GCA TGC CTG CAG GTC GAC TCT AGA GGA TCC CCG-
              GGT ACC G
MP8-40C     5'-TGC CAA GCT TGG CTG CAG GTC GAC GGA TCC-   CCG
              GGA ATT C
MP18-R1     (TR)-5'-AAA TTG TTA TCC GCT CAC AAT TGC
MP8-R2      (F)-5'-ACA CAA CAT ACG AGC CGG AAG CAT
  
```

#### 工程-1-M13捕捉配列の付着

この工程には、アミン活性化高架橋(26%)ポリアクリルアミド表面またはポリカーボネート(5-10nm)多孔性膜表面の200 $\mu$ m超微細位置を有するAPEX試験装置を用いる。

M13-C1捕捉配列は、3'-リボヌクレオチドを含有する31重体のDNAオリゴヌクレオチドである。M13-C1配列は、M13mp18およびM13mp8一本鎖(+)ベクターの3'-末端に相補的である。M13-C1捕捉配列は、全ての非切断M13ベクターにハイブリダイズし、強く結合するように設計されている。

M13-C2配列は、3'-リボヌクレオチドを含有する31重体オリゴヌクレオチドである。M13-C2は、XbaI制限部位を含有するクローニング部位

から上流のM13配列の部位に相補的である。M13-C2捕捉配列は、XbaI切断M13断片にハイブリダイズし、強く結合するように設計されている。M13-C1およびM13-C2捕捉配列は、APEX超微細位置上のアミン誘導体にカップリングさせるために、行列酸化によって活性化する。3'リボヌクレオチド末端は、第一級アミンと反応してシフ塩基を形成できる行列酸化によって末端アルデヒドに転化される。

反応条件は以下の通り：

10-200.D.のM13-C1またはM13-C2オリゴマーを水中に溶解して最終濃度1OD/ $\mu$ lとする。0.1M酢酸ナトリウム、pH5.2を1容量、および0.45M行列ナトリウム塩(水中に新たに作製)を1容量添加する。暗所下、常温にて少なくとも2時間、攪拌しインキュベート反応する。0.1Mリン酸ナトリウム、pH7.4で平衡化したセファデックスG-10カラム(パスツール・ピペット、 $0.6 \times 5.5$  cm)に反応混合物を負荷する。200  $\mu$ l画分を採取し、アリコット2  $\mu$ lを薄層クロマトグラフィー(TLC)上にスポットし、紫外線(UV)吸収画分を保存する。

APEX試験デバイスの4上面は、アドレス可能な超微細位置ML-1、ML-2、ML-3およびML-4と示される。

M13-C1は、以下の工程によってML-1およびML-2超微細位置に共有結合する：

上部および下部貯蔵器を0.1Mリン酸ナトリウム、pH7.4で満たし、バイオラド(BioRad)500/1000電力供給機を用いて0.05mA定電流で5分間プレ作動される。~0.1OD.単位の行列酸化M13-C1オリゴヌクレオチドを含有する電子工学的デリバリーシステムのチップを下部貯蔵器に設置する。電子工学的デリバリーシステムは、白金電極内側において特異的に修飾したプラスチック・ピペットチップである。0.1mAにて、電子工学的デリバリーシステムは負(-)に偏倚されており、超微細位置ML-1およびML-2は正(+)に偏倚されている。M13-C1は、定電流にて2分間ML-1およびML-2に電気泳動し、そこで表面と共有結合する。反応しなかったM13-C1をML-1お

よびML-2超微細位置から除去されるように、4分間極性を反転させる。

M13C-2配列は、前記と同一の工程で、ML-3およびML-4超微細位置に結合する。

工程2-M13ベクター、相補的配列、および蛍光性レポーター・プローブのハイブリダイゼーション

制限エンドヌクレアーゼは切断するために二本鎖DNAを必要とするため、一本鎖M13mp18のクローニング/制限部位セグメント(6240~6280)およびM13mp8(6230~6270)は相補的DNA配列とハイブリダイズしなければならない。電子工学的ハイブリダイゼーションを用いて、各々、40重体相補的断片(MP18-40C配列)をML-1/M13C-1超微細位置上のM13mp18ベクターにハイブリダイズさせ、40重体相補的断片(MP8-40C配列)をML-2/M13C-1超微細位置上のM13mp8ベクターにハイブリダイズさせた。

電子工学的ハイブリダイゼーションは、0.1mAにて2分間、0.05O.D.単位のM13mp18を含有する電子工学デリバリーシステムを負(-)に偏倚させ、かつML-1/MP13C-1超微細位置を正(+)に偏倚させることによって

行う。極性を4分間反転させ、ハイブリダイズしなかったM13mp18を超微細位置から除去する。同一の工程を用いて、M13mp8ベクターをML-1/M13C-1超微細位置に電子工学的にハイブリダイズさせる。

次いで、M13mp18およびM13mp8配列を、2種の異なる蛍光レポーター・プローブと電子工学的にハイブリダイズさせる。ML-1/M13C-1超微細位置上のM13mp18ベクターは、24重体テキサス・レッド標識レポーター・プローブ(MP18-R1配列)と電子工学的にハイブリダイズさせ、これはクローニング/制限部位の5'-末端にハイブリダイズする。M13mp8ベクターは、24重体フルオレセイン標識レポーター・プローブ(MP8-R2配列)と電子工学的にハイブリダイズさせ、これはクローニング/制限部位の5'-末端にハイブリダイズする。

工程3-XbaI制限酵素を用いたM13mp18ベクターの制限切断



それらの等電点( $pI$ )に依存して、 $pH$  5-9の範囲で、多くの蛋白質および酵素を負( $pH > pI$ )に、中性( $pH = pI$ )に、または正( $pH < pI$ )に荷電させることができる。数多くの制限エンドヌクレアーゼは、6-7の範囲内に $pI$ を有する。 $pI$ より高い $pH$ では、これらの酵素は負の電荷を運んでいるであろう。従って、 $pH > 7$ の緩衝溶液中で自由フィールド電気泳動を行う場合、これらの酵素は正に荷電した超微細位置に移動するであろう。

制限エンドヌクレアーゼのような多くのDNA修飾酵素の場合、迅速な電気泳動移動度と最適酵素活性とが釣り合う $pH$ を供する緩衝溶液を選択するのが常に望ましい。ある場合においては、 $pI$ より上およびそれより以下の両方の合理的酵素活性を有することが可能である。これらの酵素は、選択した $pH$ に応じて、正または負のいずれかに偏倚した超微細位置に向かって移動することができる。

ML-1におけるM13mp18ベクターのXbaI切断は以下のように行う。電子工学デリバリー・システムを用いて、最初にXbaIエンドヌクレアーゼをML-1/M13mp18超微細位置まで自由フィールド電気泳動させる。0.1mAにて2分間、 $pH$  7.6の緩衝液中に100ユニットのXbaIを含有する

電子工学デリバリー・システムを負に偏倚させ、ML-1/M13mp18超微細位置を正に偏倚させる。次いで、電流を0.02mAに3分間低下させる。電子工学デリバリー・システムは切るが、0.1mAにて5分間、ML-1/M13mp18超微細位置は負に偏倚させ、ML-3/M13C-2超微細位置は正に偏倚させる。今度は、XbaIおよびハイブリダイズしなかった断片をML-3/M13C-2超微細位置から除去するために、ML-3/M13C-2超微細位置を負に偏倚させ、電子工学デリバリー・システムを切り、0.1mAにて2分間正に偏倚させる。

エピ蛍光顕微鏡による観察は、ML-1/M13mp18超微細位置における赤色蛍光シグナルの消失、およびML-3/M13C-2超微細位置における赤色蛍光シグナルが存在することを示し、M13mp18ベクターがXbaI切断されたことを証明している。同一の基本XbaI切断法を今度は、負対照として供す

る、ML-2/M13mp8超微細位置について繰り返す。M13mp8ベクターはXbaI部位を有していないため、断片の切断および生成は不可能である。かくして、ML-2/M13mp18超微細位置はその緑色蛍光シグナルを維持するが、ML-4/M13C-2超微細位置では蛍光シグナルは全く認められない。

第二の実施例には、デバイス上のアドレス可能な超微細位置に共有結合する制限酵素で行う制限切断反応が含まれる。この場合において、制限エンドヌクレアーゼは誘導化され、APEXデバイス上のアドレス可能な超微細位置まで自由フィールド電気泳動され、そこでそれらは共有結合するであろう。制限酵素を固形指示体に誘導化させ、共有結合させる方法は当業者に知られている。種々の異なる制限酵素をAPEXデバイスにアドレスすることができた。特異的切断反応は、自由フィールド電気泳動を用いて、所望の制限エンドヌクレアーゼを含有する超微細位置にds-DNAベクターまたはDNA試料を濃縮することによって行われるであろう。ds-DNAを切断し、次いでデバイス上の他の超微細位置まで断片を移動させる。その際に、所望の、または有用な他のDNA修飾酵素をAPEX・デバイス上のアドレス可能な超微細位置にカップリングすることができる。また、この実施例はDNA修飾酵素に限定するものではなく、大部分の他

の酵素をAPEX・デバイス上のアドレス可能な超微細位置に付着させることができる。

#### 実施例12： 電子工学増幅法

標的配列のコピー数が非常に少ない場合(例えば、HIV、敗血症感染、他)には、精製標的DNAおよび/またはRNAを直接的にAPEX・デバイス上で増幅させることによって、標的DNA配列の複製または増幅により感度を改善することができるであろう。また、増幅によって、ハイブリダイゼーション分析を行う前に非常に高収率の分取工程を行う必要性も減じられるであろう。

APEX増幅プロトコールによって、DNA運動、変性および合成反応の完全な電子工学的制御が提供される。最も重要なことは、高温の使用または高熱耐性ポリメラーゼまたは他の熱安定性酵素を使用することなく、DNAハイブリッドを電子工学的に変性させることである。

第一の実施例として、DNAポリメラーゼ(大きな方のクレノー断片)を用い、かつ熱サイクルの必要性なしに、DNA合成を非常に忠実に行うことができる。この実施例においては、超微細位置に共有結合させたままの方法で1本のDNA鎖が複製される。この工程は、以下の様式で行う：1) アドレスされた超微細位置上の公知の配列の捕捉プローブに公知の標的配列を電子工学的にハイブリダイズさせ、2) 捕捉プローブにより鋳型化されたDNAポリメラーゼ鋳型化によって発生しようとする相補的DNA鎖(－)を合成を行い、3) 新たに合成したDNAハイブリッドを電子工学的に変性させ、4) 標的DNAを非-伸長捕捉プローブにアニーリングさせ、－鎖相補的プローブを発生しようとしている－鎖DNAにアニーリングさせ、5) 発生しようとしている標的DNA(＋)鎖をDNAポリメラーゼによって合成し、2と同様に－鎖DNAを同時に合成し、それによって＋および－鎖の数を倍加させ、各回にこの工程を繰り返し、次いで6) 特異的に設計した相補的プローブにハイブリダイズさせることによって増幅標的をサイズ選択する。図17に示す完全な工程を以下にさらに詳細に記載する：

#### 工程1) 捕捉プローブへの標的配列の付着

標的配列を(1)共有結合した捕捉プローブを含有する超微細位置に光電子工学的に輸送する。標的配列は、非-標的(ゲノム)配列中に存在するかもしれないが、アニーリングさせてプローブを捕捉する前に変性させなければならない。最初に捕捉されるであろう標的配列は種々の長さであろう。

#### 工程2) 標的に相補的なDNAの合成

DNAポリメラーゼおよびdNTPを超微細位置1に光電子工学的に輸送する。捕捉プローブはDNAポリメラーゼに3'末端を、捕捉標的配列は鋳型を提供する。合成に影響を受けやすい試薬の濃度を維持するのに十分な電流を流す。電流は定電流または変調電流とすることができる。これらの指標を操作すれば、異なった範囲の長さの発生しようとする相補的(－)鎖を得ることができる。

#### 工程3) 新たに合成した鎖の電子工学的変性

超微細位置1の極性を反転させ、電位をかけて2本鎖を分離させる。電位およびかけた時間の量は、ハイブリッドDNA複合体の長さおよび塩基組成に依存す

るであろう。これらの指標は、経験的、または電子工学変性曲線から計算して決定することができる。

工程4) プライマー(捕捉および相補的プローブ)のDNA鎖へのアニーリング  
+および-DNA鎖の両方にアニーリングさせてDNAポリメラーゼ用のプライマーを得るにはオリゴが必要である。標的または+鎖については、このことを非-伸長捕捉プローブまでの+鎖の電子工学的輸送によって達成される。このことにより、過剰に伸長し、共有結合した-鎖DNAと同じくらいの長さの非-伸長捕捉プローブを発生させるであろう。相補的プローブを超微細位置まで電気泳動して-鎖DNAに共有結合させる。今度は、+および-の両方の鎖がそれらに結合するプライマーを有し、合成を触媒する鋳型DNAポリメラーゼである(図参照)。

相補的プローブの結合性は非共有結合-鎖DNAで発生させることもできるが、これらのハイブリッドは電子工学的に変性され、それ故全体的な増幅にはほとんど影響を有してはならない。

工程5) 2本の新しいDNA鎖の合成

工程2を繰り返し、+および-鎖が鋳型形成を開始した時から、配列特異的DNAの量は倍加する。DNA量におけるこの幾何学的増加は、繰り返したこれらの工程の各回で起こるであろう。

工程6) 増幅標的配列のサイズ選抜

相補的プローブのヌクレオチド配列は、増幅標的DNAのサイズおよび配列を決定するであろう。従って、増幅DNAは慣例設計して、二次分析および/または操作の効率の向上させることができる。

他の酵素を本発明の増幅法用いることができ、それらには、限定するものではないが、他のDNAポリメラーゼ、T7またはSP6RNAポリメラーゼ、逆転写酵素、DNAリガーゼおよびポリヌクレオチド・ホスホリラーゼ、ならびに他の核酸修飾酵素(エンドヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ、他)との組合せが含まれる。

実施例13: 電子工学コントローラーおよびデータ・システム

APEX・チップまたはマイクロマシーン加工デバイスのいずれであろうと、全てのデバイスは、超微細位置(またはマクロ-位置)のアドレス可能なアレイの性質であろう。コンピューター・コントロール/データ収集システムは、電子工学電位をアレイ中のいずれのパッドにも独立して流せるよう、微細位置-電極システムを結果として流れた電流が測定されるように設計されている。コンピューター制御/データ収集インターフェースによって：

a) 超微細位置のアレイの表示

高いレベルおよび低いレベルの表示によって、最も高いレベルにおける遮断を解決するために、および低いレベルにおける超微細位置の遮断を十分に解決するために、全超微細位置の図が提供される。

b) 超微細位置上をクリックすると超微細位置の特性を説明する超微細位置のウインド図が立ち上がり、種々の形態、電位の大きさおよび様子の信号の時間配列他、他の超微細位置のものに重複する制御配列の表示、他で超微細位置の制御が設定できるであろう。また、該システムは、他の超微細位置を形成するデータとの統計学および比較で超微細位置につき収集したデータおよび信号も表示する。一覧表によって、制御設計、認められた実際の制御信号および収集したデータについての解析、分類システムおよび保管文書機能が提供される。

c) ソフトウェアによって、b) に記載したアレイ制御ソフトウェアからのインプットによって制御されるハードウェア・インターフェースを通して全てのスイッチングおよびデータ収集が提供される。

d) 別々のハードウェアおよびソフトウェアシステムによって、イメージ収集および処理能力が提供される。このシステムは、超微細位置のアレイを映し、活性超微細位置におけるDNA結合相互作用からの蛍光信号を記録して、DNA結合実験の結果を読み出す。イメージ処理ソフトウェアによって、これらのイメージを定量的に処理し、定量的なアッセイ結果を抽出することができる能力が提供される。このソフトウェアは、アレイ制御/データ収集ソフトウェアと完全にインターフェースで接続されており、APEXデバイス制御/電極の電流データおよびイメージング・データからのアッセイ結果を全て記録する集中システムを提

供し、該データを解析してこれらの結果の整合性および信頼性に関する補助的な情報と一緒にアッセイに関する結果を減少させて、全てのデータおよび解析を保管する。

e) A P E Xコントローラーには、このソフトウェア、および「アッセイ中」および「結果」の表示のみを提供する上層と、要すれば a) ないし c) の機能にアクセスするボタンが組み込まれるであろうが、a) ないし c) は全ての場合において収集され、保管されるであろう。

f) 開発対象に用いるべき初期バージョンのコントローラーはホスト・コン

ピュータとしてマッキントッシュ・クアドラ(Macintosh Quadra)950を用い、該クアドラ950と接続したナショナル・インスツルメンツ(National Instruments)ボードを用いて前記のハードウェア・インターフェースを提供する。これらのボードは種々の電流をA P E X超微細位置に流し、結果として電極システムを流れる電位を測定する。このコントローラーで用いるナショナル・インスツルメンツ(National Instruments)ボードは、ハイ・レゾリューション・マルチファンクション(High Resolution Multifunction) I/Oボード、NB-MIO-16XL-18、アナログ・アウトプット(Analog Output)・ボード、NB-AO-6、タイミング・インプット/アウトプット(Timing Input/Output)・ボード、NB-TIO-10、ブロック・モード(Block Mode)DMA・アンド・GPIBインターフェイス(Interface)・ボード、NB-DMA2800、ならびにアナログ・シグナル・コンディショニング・モジュール(Analog Signal Conditioning Modules)・ボードおよび熱電対用のモジュール、ならびに他の環境センサー5bシリーズである。クアドラ中のNuBusボードおよびA P E Xデバイス間の接続は、SCXI-1001フレームに収められたSCXI 16-チャンネルSPDTリレイ・モジュール・ボードを通されるであろう。

#### 実施例14：電子工学制御試料の調製およびハイブリダイゼーション分析-集中A P E Xシステム

試料調製には、通常細胞の選抜；細胞性物質の破碎(例えば、消化)、ならびに一連の分離工程および親和性反応が含まれる。試料調製は、分子生物学的反応に

にとって重要である。例えば、試料調製工程における非効率により実際の標的DNA配列量が多量に失われるため、ハイブリダイゼーション・アッセイはしばしば制限される。

電子工学制御の基本的なAPEX概念は、DNAハイブリダイゼーション・アッセイにおける試料調製に用いることができる。電子工学的な方法によって、APEX部品の活性な電子工学システム上で行うべき試料調製、細胞選抜および分析が可能であろう。試料調製は、細胞の選抜および消化、ならびに試料中の細

胞性および異質の物質からのDNAの粗分離で開始するであろう。電子工学的デバイスは、該試料DNAを電子工学的に処理して、他の物質を除去しつつ、デバイスの分析部品に向けて効率的に移動させる。該システムは、標的DNAの効率的加工用の適当なスケーリング因子を提供する。ヒトゲノム解析について、電子工学的試料調製には、大部分の非-特異的DNAが標的DNAから分離されるであろう高効率プレ-ハイブリダイゼーション工程が含まれるであろう。

試料調製については、集中デバイスまたは完全APEXシステムは、相対的に粗試料(血液、痰、尿他)を採取し、最小限の機械的操作および流体力学でそれを処理し、次いで標的DNAを該デバイスの分析部品に電子工学的にデリバリーする。この「活性電子工学加工」は、一般的には手動の工程および技術の機械的バージョンである自動制御またはロボティクス加工とは異なる。

DNA試料調製および分析のための集中APEX・システムは、全て一般APEX概念に基づく多数の部品を用いて加工することができる。システムの構成要素には(1)電子工学細胞セクター・ユニット；(2)電子工学試薬調剤ユニット；(3)電子工学不要の一回使用ユニット；(4)粗DNAセクター・ユニット；(5)第二DNAまたは制限断片セクター・ユニット；(6)DNA断片保存ユニット；および(7)APEX分析ユニット(チップ)が含まれる。集中APEXシステムを図18に示す。

かかるシステムは、大きなケイ素ウェハー上に加工することができる。別法として、個々の構成要素は、微細リソグラフィーまたはマイクロマシン加工技術によって加工でき、特別に設計したプラットフォームユニットを配置する(例え

ば、接続する)ことができる。完全なシステムの構成要素は、それらの有効領域が相対的な試料のサイズおよび(細胞のごとき)該試料中の物質の量に対して一定の比率で拡大(縮小)されるように設計されている。例えば、セル・ソーター有効領域は、一般的に粗DNAセクター有効領域よりも大きいであろうし、次ぎにそれは制限断片APEX分析チップ有効領域よりも大きいであろうし、APEXチップ有効領域よりも大きいであろう。

実施例として、該セル・ソーター「有効面積」は数 $\text{cm}^2$ のオーダーとするこ

とができるが、64超微細位置APEX分析構成要素についての合計「有効面積」は $1\text{mm}^2$ 未満であろう。プラットフォーム・ユニットは、密閉共通緩衝液貯蔵器中の全ての構成要素ユニットを支持するように設計されている。数百 $\mu\text{l}$ にのぼる適当な試料は、セルセクター構成要素付近の試料添加口を通して該システムに添加する。セル・セクター構成要素は、異なる細胞型につき1またはそれを超える選択親和性を有することができる大きなスケールのAPEXデバイスである。これらの親和性の選択は、細胞表面電荷、ハプテンおよび抗原に基づいて行うことができる。

実施例として、全血液試料の親和性選択は、白血球細胞(リンパ球、他)を赤血球細胞から選択することができる。高い選択工程を用いて、肉体的血液試料から胎児細胞を選択することができる。また、感染性微生物(公募、カビ、最近およびウイルス)について親和性選択をすることもできる。選択された細胞がセル・セクター構成要素付着して残るのに対して；全ての他の細胞および蛋白質物質は消費一回使用ユニットに輸送される。この時点で、荷電した洗浄剤、および/またはカオトロピック剤、および/または適当な消化酵素および蛋白質分解酵素(リゾチーム、プロテインキナーゼK、ペプシン、他)の電子工学試薬調剤ユニットからセル・セクター・ユニット上の細胞までの自由フィールド電気泳動輸送によって細胞を消化することができる。電子工学消費一回使用システムを適当に偏倚させることによって、ある種の消化消費物質を除去することができる。粗DNAセクター・ユニットを正に偏倚させることによって、今度はこの構成要素まで粗核酸(DNA/RNA)物質を輸送することができる。



粗DNAセクターは、DNAに対して一般的な親和性を有するAPEXデバイスである。この親和性は、正に荷電した表面、または共通または反復性のDNA配列を含有する表面である。例えば、Alu繰り返し捕捉配列は、ヒト細胞から抽出した大部分の粗DNAを効率的に捕捉するであろう。感染症分析が対象である場合には、共通または属に共通の細菌またはウイルス配列を用いることができる。DNAから外来物質を除去することに加えて；該APEX・システムは、試料DNAの複合性を減少させるようにも設計されている。このことは、制限酵素

を用いて、粗DNAセクター・ユニットでDNAを選択的に切断することによって達成することができる。該制限酵素は、試薬調剤ユニットから輸送される。切断制限断片は、今度は、それを正に偏倚することによって、第二DNAまたは制限断片セクター・ユニットから輸送される。このユニットは、その表面上の適当な捕捉配列を用いて、大きな断片のDNAに選択的に結合するように設計されている。

この時点で、選択されたDNA断片は、ハイブリダイゼーション分析のためにAPEX分析チップまで輸送される。また、DNA断片は貯蔵ユニット、あるいはシステムの外部にさえ輸送することができる。前記の実施例は、試料調製および複数ハイブリダイゼーション分析に可能なシナリオのほんの幾つかを示している。構成要素の結合親和性がプログラム可能なこと、および結合した異なる構成要素および機能の融通性によって、広範な種々の工程を行うことができる。

DNAを第一の例として用いたが、前記のデバイスおよび方法は、標的RNA分子、蛋白質、多糖、脂質および他の巨大分子の加工および分析にも用いることができる。

各刊行物に掲載されている核酸配列およびアミノ酸配列を含む、参照した全ての刊行物は出典明示して本明細書の一部とみなす。

他の具体例も以下の請求の範囲の範囲内である。

## 配 列 表

## (1)一般情報:

(i)出願人:           マイケル・ジェイ・ヘラー(Michael J. Heller)  
                        ユージン・チュー(Eugene Tu)  
                        グレン・エイ・エバンス(Glen A. Evans)  
                        ロナルド・ジイ・ソスノウスキー(Ronald G. Sosnoeski)

(ii)発明の名称: 分子生物学的分析および診断用の自己アドレス指定可能な  
超小型電子システムおよびデバイス

(iii)配列の数: 45

## (iv)通信住所:

(A)受信人:           ライオン・アンド・ライオン(Lyon & Lyon)  
(B)通り:           ウエスト・シックスス・ストリート611番  
(C)都市:           ロスアンゼルス  
(D)州:           カリフォルニア州  
(E)国籍:           合衆国  
(F)郵便番号:        90017

## (v)コンピューター判読形式:

(A)媒体の型:        3.5' ディスケット、1.44Mb 保存  
(B)コンピューター:   IBMコンパチブル  
(C)オペレーティング・システム:   IBM P.C.DOS(バージョン5.0)  
(D)ソフトウェア:    ワードパーフェクト(バージョン5.1)

## (vi)最新出願データ:

(A)出願番号:        08/271,882  
(B)出願日:        1994年7月7日  
(C)分類:

## (vii)先の出願データ:

(A)出願番号： 08/146,504

(B)出願日： 1993年11月1日

(v i i i)代理人/代理事務所情報：

(A)氏名： マーフィー, デイビッド・バイ  
(Murphy, David B.)

(B)登録番号： 31,125

(C)参照/ファイル番号 207/263

(i x)電信電話通信情報：

(A)電話番号： (213)489-1600

(B)ファックス番号： (213)955-0440

(C)テレックス番号： 67-3510

(2)配列番号：1に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 24  
(B)配列の型： 核酸  
(C)鎖の数： 一本鎖  
(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：1：

GCT ACG CCC TGC TCA TGA GTC TCU

24

(2)配列番号：2に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 21  
(B)配列の型： 核酸  
(C)鎖の数： 一本鎖  
(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：2：

AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAU

21

## (2)配列番号：3に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	34
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (i i)配列：配列番号：3：

CTA CGT GGA CCT GGA GAG GAA GGA GAC TGC CTG U

34

## (2)配列番号：4に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	20
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (i i)配列：配列番号：4：

GAG TTC AGC AAA TTT GGA GU

20

## (2)配列番号：5に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	20
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (i i)配列：配列番号：5：

CGT AGA ACT CCT CAT CTC CU

20

## (2)配列番号：6に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	18
(B)配列の型：	核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：6：

GTC TCC TTC CTC TCC AGU

18

(2)配列番号：7に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 20

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：7：

GAT GAG CAG TTC TAC GTG GU

20

(2)配列番号：8に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 18

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：8：

CTG GAG AAG AAG GAG ACU

18

(2)配列番号：9に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 22

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：9：

TTC CAC AGA CTT AGA TTT GAC U

22

## (2)配列番号：10に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	20
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (ii)配列：配列番号：10：

TTC CGC AGA TTT AGA AGA TU 20

## (2)配列番号：11に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	20
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (ii)配列：配列番号：11：

TGT TTG CCT GTT CTC AGA CU 20

## (2)配列番号：12に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	20
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (ii)配列：配列番号：12：

CAG CGC TGT GAC AAA ACA TU 20

## (2)配列番号：13に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	20
(B)配列の型：	核酸

(C)鎖の数 :

一本鎖

(D)トポロジー

直鎖状

(i i)配列 : 配列番号 : 1 3 :

TGC GAG CTG CAG TCA GAC AT

20

(2)配列番号 : 1 4 に関する情報 :

(i)配列の特性 :

(A)配列の長さ :

1 8

(B)配列の型 :

核酸

(C)鎖の数 :

一本鎖

(D)トポロジー

直鎖状

(i i)配列 : 配列番号 : 1 4 :

GAG AGA CTC ATG AGC AGG

18

(2)配列番号 : 1 5 に関する情報 :

(i)配列の特性 :

(A)配列の長さ :

1 8

(B)配列の型 :

核酸

(C)鎖の数 :

一本鎖

(D)トポロジー

直鎖状

(i i)配列 : 配列番号 : 1 5 :

CCT CGT CAT GAG TCT CTC

18

(2)配列番号 : 1 6 に関する情報 :

(i)配列の特性 :

(A)配列の長さ :

1 9

(B)配列の型 :

核酸

(C)鎖の数 :

一本鎖

(D)トポロジー

直鎖状

(i i)配列 : 配列番号 : 1 6 :

TTT TTT TTT TTT TTT TTT T

19

## (2)配列番号：17に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	33
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (ii)配列：配列番号：17：

CAG GCA GTC TCC TTC CTC TCC AGG TCC ACG TAG 33

## (2)配列番号：18に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	19
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (ii)配列：配列番号：18：

CTC CAA ATT TGC TGA ACT C 19

## (2)配列番号：20に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	19
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (ii)配列：配列番号：20：

GGA GAT GAG GAG TTC TAC G 19

## (2)配列番号：21に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	17
(B)配列の型：	核酸



(C)鎖の数 :	一本鎖	
(D)トポロジー	直鎖状	
(i i)配列 : 配列番号 : 2 1 :		
CTG CAG AGG AAG GAG AC		17
(2)配列番号 : 2 2 に関する情報 :		
(i)配列の特性 :		
(A)配列の長さ :	1 9	
(B)配列の型 :	核酸	
(C)鎖の数 :	一本鎖	
(D)トポロジー	直鎖状	
(i i)配列 : 配列番号 : 2 2 :		
CCA CGT AGA ACT GCT CAT C		19
(2)配列番号 : 2 3 に関する情報 :		
(i)配列の特性 :		
(A)配列の長さ :	1 7	
(B)配列の型 :	核酸	
(C)鎖の数 :	一本鎖	
(D)トポロジー	直鎖状	
(i i)配列 : 配列番号 : 2 3 :		
GTC TCC TTC TTC TCC AG		17
(2)配列番号 : 2 4 に関する情報 :		
(i)配列の特性 :		
(A)配列の長さ :	2 1	
(B)配列の型 :	核酸	
(C)鎖の数 :	一本鎖	
(D)トポロジー	直鎖状	
(i i)配列 : 配列番号 : 2 4 :		
GTC AAA TCT AAG TCT GTG GAA		21

## (2)配列番号：25に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	19
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (ii)配列：配列番号：25：

ATC TTC TAA ATC TGC GGA A

19

## (2)配列番号：26に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	19
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (ii)配列：配列番号：26：

GTC TGA GAA CAG GCA AAC A

19

## (2)配列番号：27に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	19
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (ii)配列：配列番号：27：

ATG TTT TGT CAC AGC GAT G

19

## (2)配列番号：28に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	30
(B)配列の型：	核酸

(C)鎖の数:

一本鎖

(D)トポロジー

直鎖状

(i i)配列: 配列番号: 28:

GGT GGT GGG CGC CGG CGG TGT GGG CAA GAU

30

(2)配列番号: 29に関する情報:

(i)配列の特性:

(A)配列の長さ:

30

(B)配列の型:

核酸

(C)鎖の数:

一本鎖

(D)トポロジー

直鎖状

(i i)配列: 配列番号: 29:

GGT GGT GGG CGC CGT CGG TGT GGG CAA GAU

30

(2)配列番号: 30に関する情報:

(i)配列の特性:

(A)配列の長さ:

15

(B)配列の型:

核酸

(C)鎖の数:

一本鎖

(D)トポロジー

直鎖状

(i i)配列: 配列番号: 30:

CC GCG GCC GCC ACA C

15

(2)配列番号: 31に関する情報:

(i)配列の特性:

(A)配列の長さ:

15

(B)配列の型:

核酸

(C)鎖の数:

一本鎖

(D)トポロジー

直鎖状

(i i)配列: 配列番号: 31:

CC GCG GCA GCC ACA C

15

## (2)配列番号：32に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	15
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (ii)配列：配列番号：32：

CC TGT GCA GCC ACA C

15

## (2)配列番号：33に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	30
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (ii)配列：配列番号：33：

GGT GGT GGG CGC CGG CGG TGT GGG CAA GAU

30

## (2)配列番号：34に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	29
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (ii)配列：配列番号：34：

GGT GGT GGG CGC CGG CGG TGT GGG CAA GA

29

## (2)配列番号：35に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	22
(B)配列の型：	核酸

(C)鎖の数 :

一本鎖

(D)トポロジー

直鎖状

(i i)配列 : 配列番号 : 35 :

TGC CCA CAC CGC CGG CGC CCA C

22

(2)配列番号 : 36に関する情報 :

(i)配列の特性 :

(A)配列の長さ :

22

(B)配列の型 :

核酸

(C)鎖の数 :

一本鎖

(D)トポロジー

直鎖状

(i i)配列 : 配列番号 : 36 :

TGC CCA CAC CGA CGG CGC CCA C

22

(2)配列番号 : 37に関する情報 :

(i)配列の特性 :

(A)配列の長さ :

?

(B)配列の型 :

核酸

(C)鎖の数 :

一本鎖

(D)トポロジー

直鎖状

(i i)配列 : 配列番号 : 37 :

TGC CCA CAC CAC CGA CGG TGC CCA C

22

(2)配列番号 : 38に関する情報 :

(i)配列の特性 :

(A)配列の長さ :

7

(B)配列の型 :

核酸

(C)鎖の数 :

一本鎖

(D)トポロジー

直鎖状

(i i)配列 : 配列番号 : 38 :

ACA CCG C

7

## (2)配列番号：39に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	7
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (ii)配列：配列番号：39：

ACA ACG C

7

## (2)配列番号：40に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	31
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (ii)配列：配列番号：40：

CCA GTC ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG U

31

## (2)配列番号：41に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	31
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (ii)配列：配列番号：41：

GTA ATC ATG GTC ATA CGT GTT TCC TGT GTG U

31

## (2)配列番号：42に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	40
(B)配列の型：	核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：4 2：

GCA TGC CTG CAG GTC GAC TCT AGA GGA TCC CCG GGT ACC G 40

(2)配列番号：4 3に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 4 0

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：4 3：

TGC CAA GCT TGG CTG CAG GTC GAC GGA TCC CCT GGA ATT C 40

(2)配列番号：4 4に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 2 4

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：4 4：

AAA TTG TTA TCC GCT CAC AAT TGC 24

(2)配列番号：4 5に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 2 4

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：4 5：

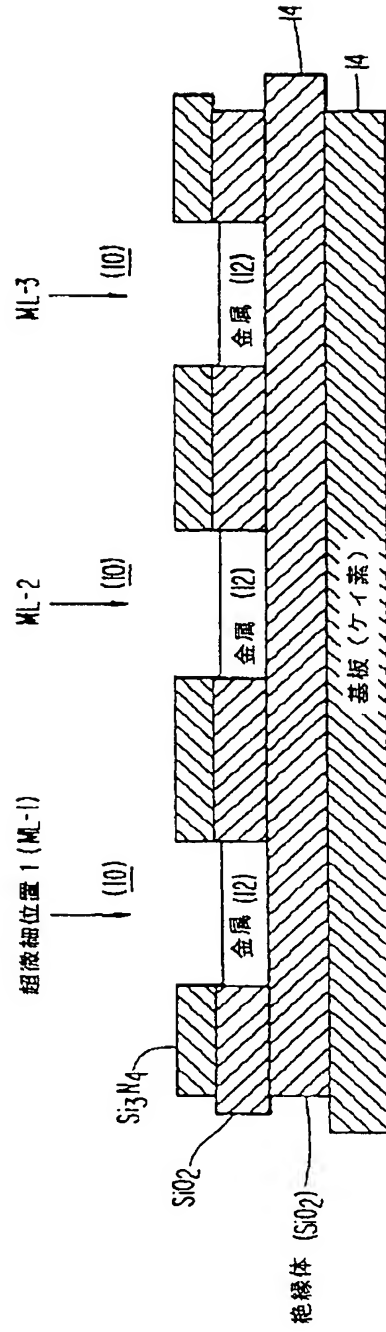
ACA CAA CAT ACG AGC AGC CGG AAG CAT 24

【図 1】

(108)

特表平9-503307

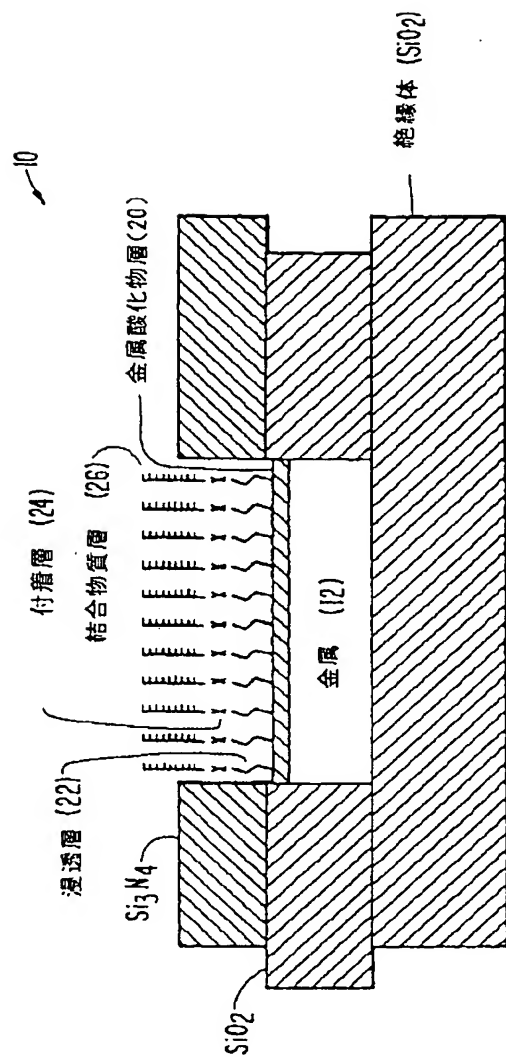
FIG. 1.





【図2】

FIG. 2.

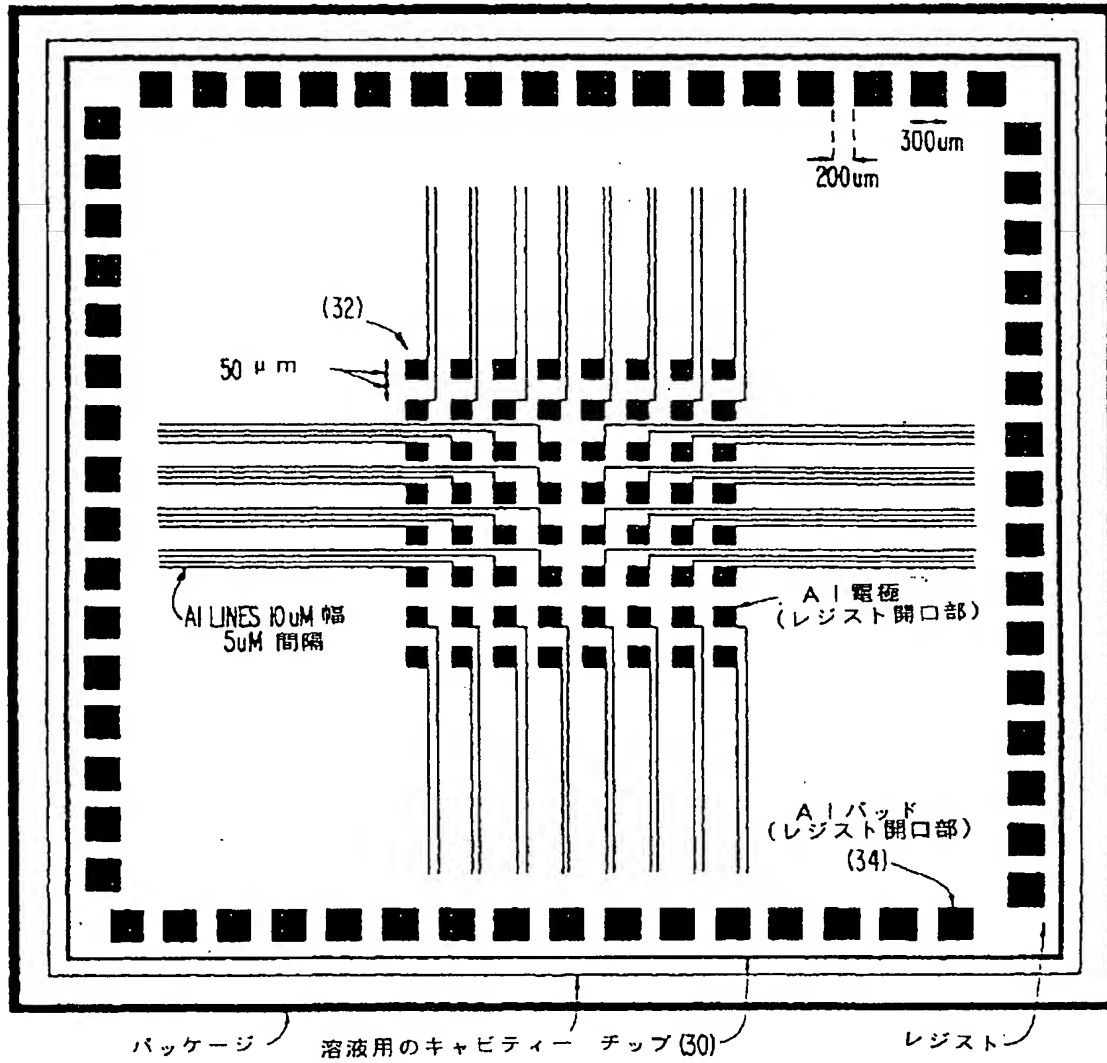


(109)

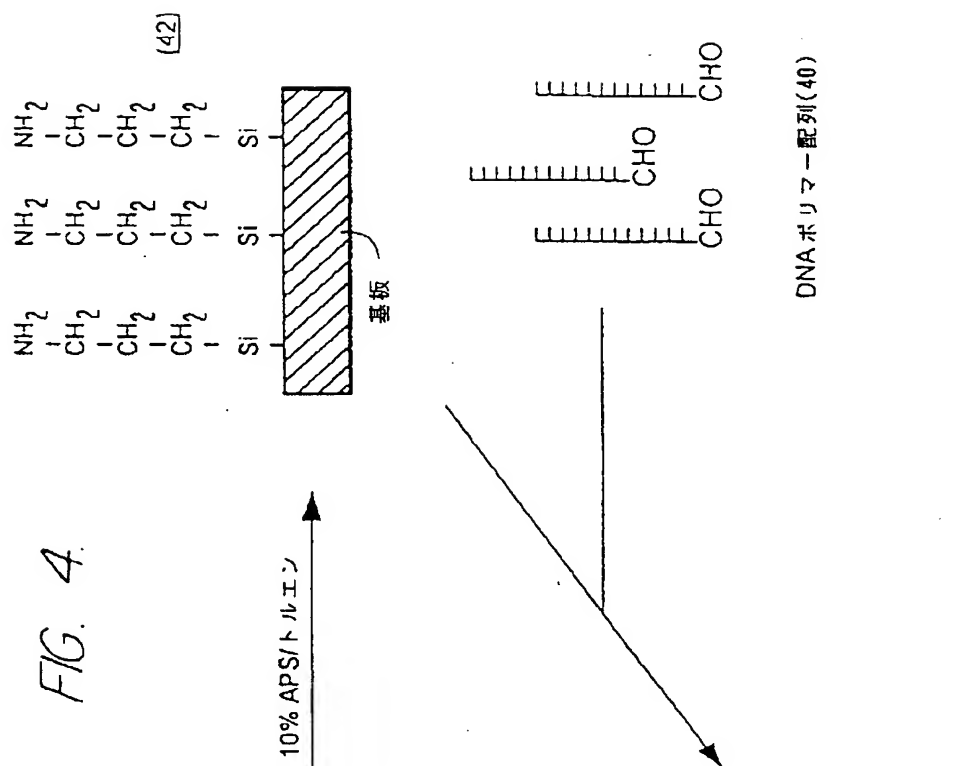
特表平9-503307

【図3】

FIG. 3.



【図4】



【図5】

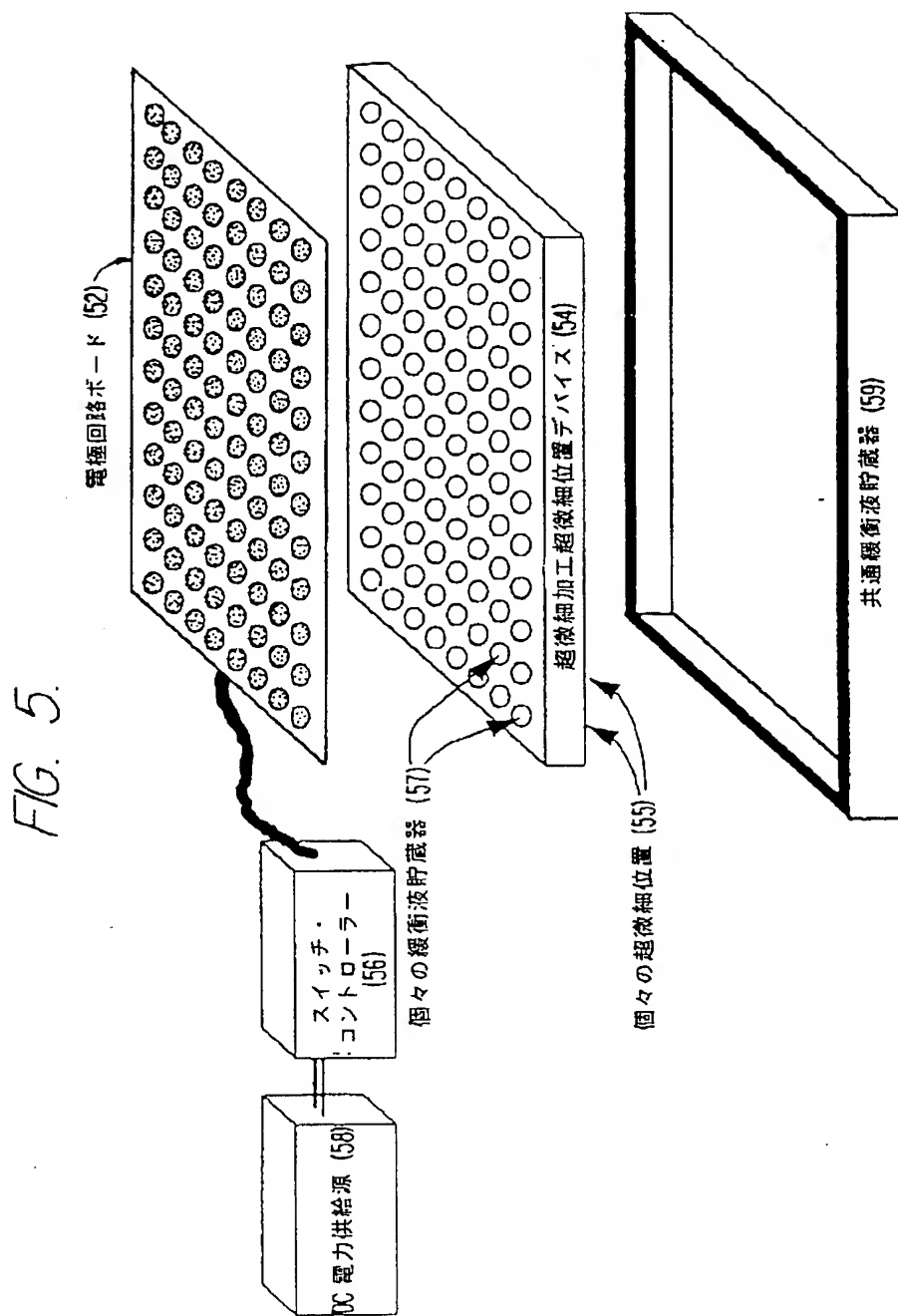
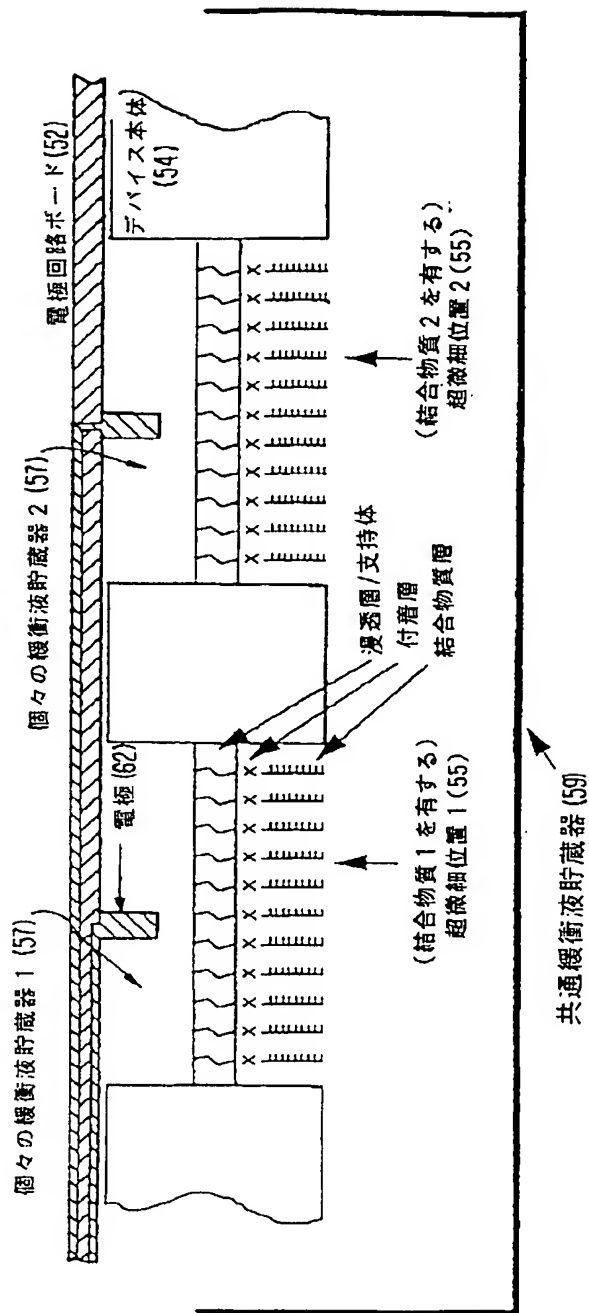


FIG. 6.



【図7】

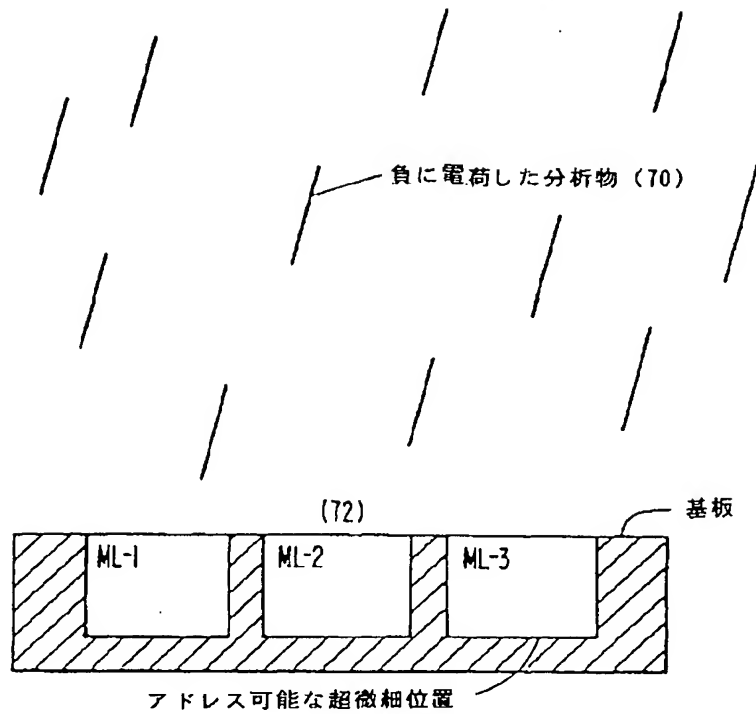


FIG. 7a.

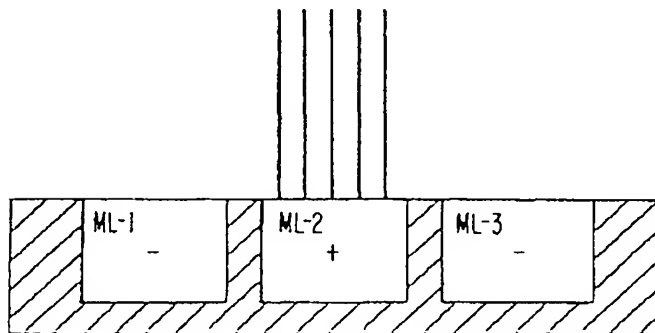


FIG. 7b.

【図8】

FIG. 8a.

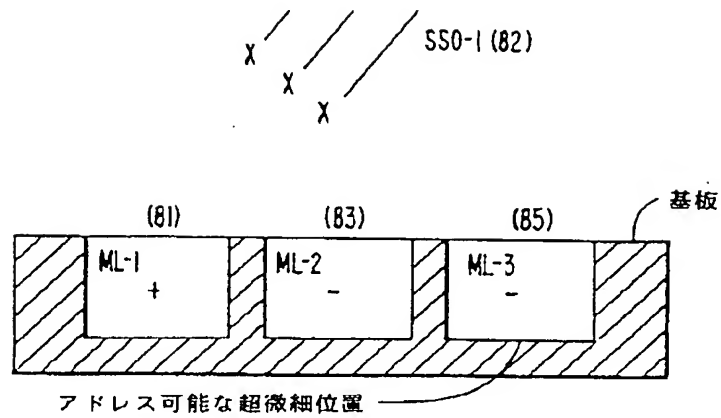


FIG. 8b.

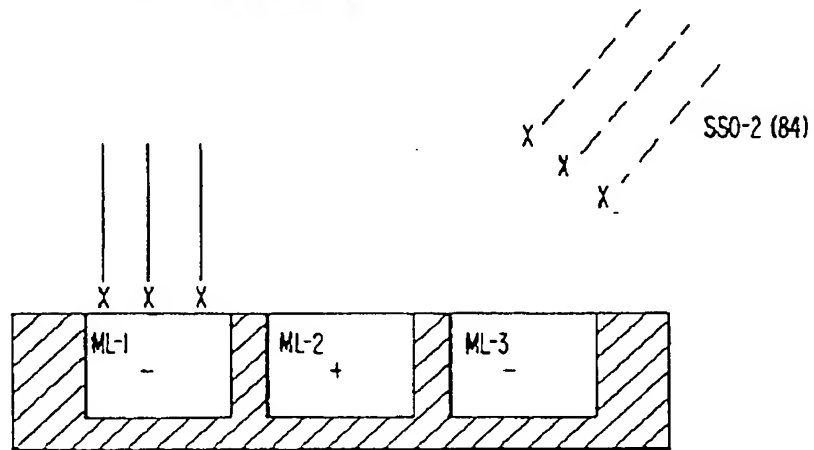


FIG. 8c.

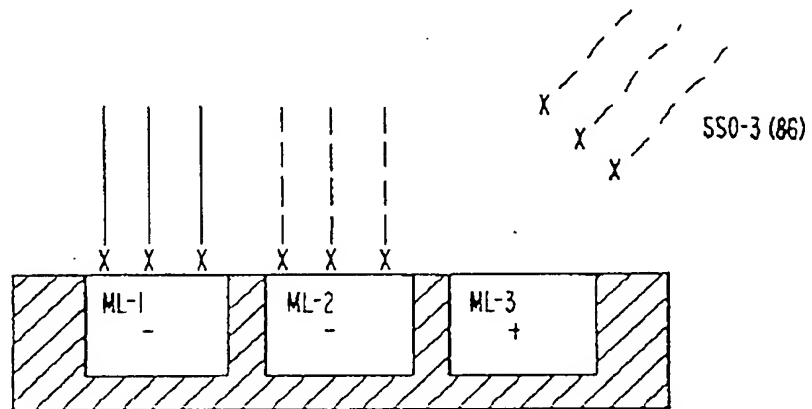
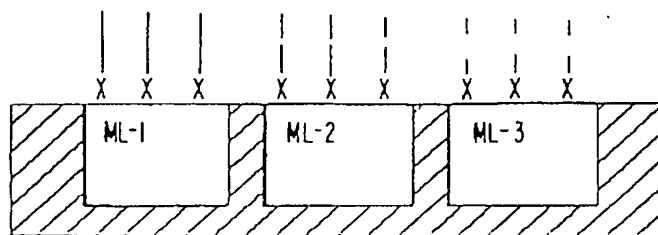
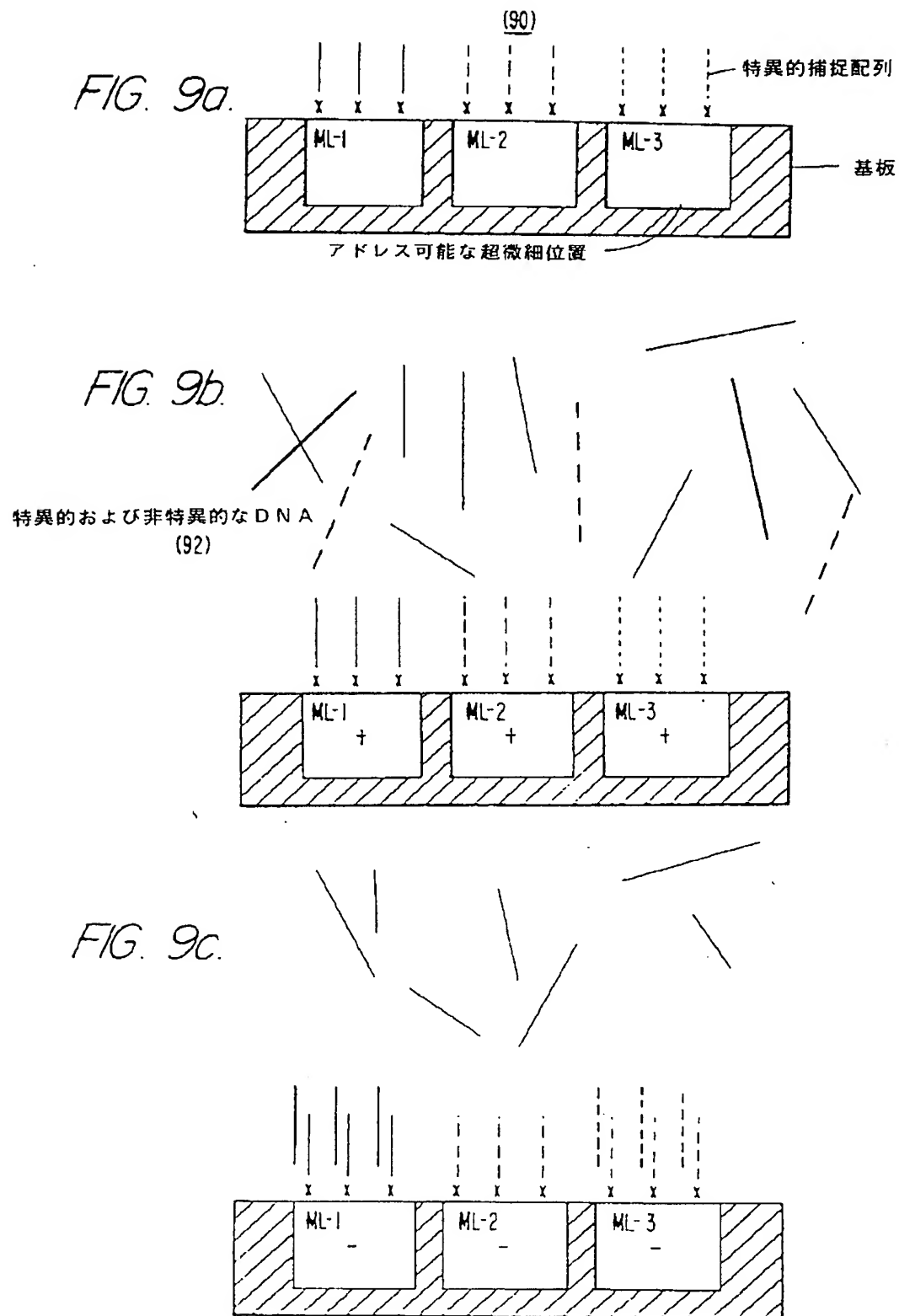


FIG. 8d.

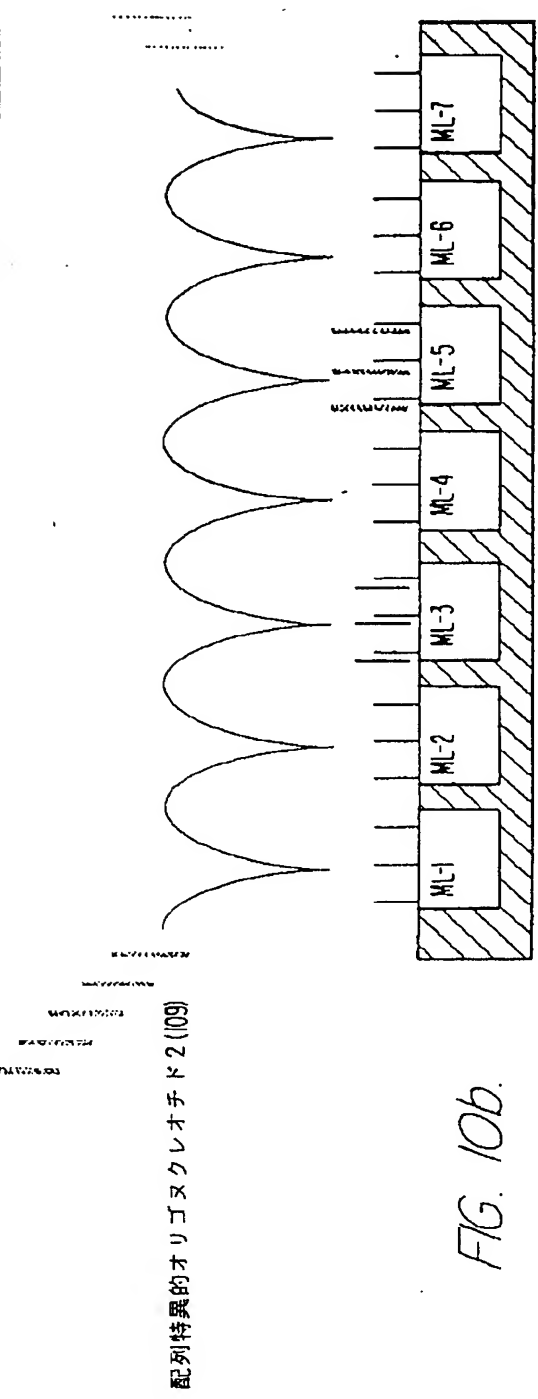
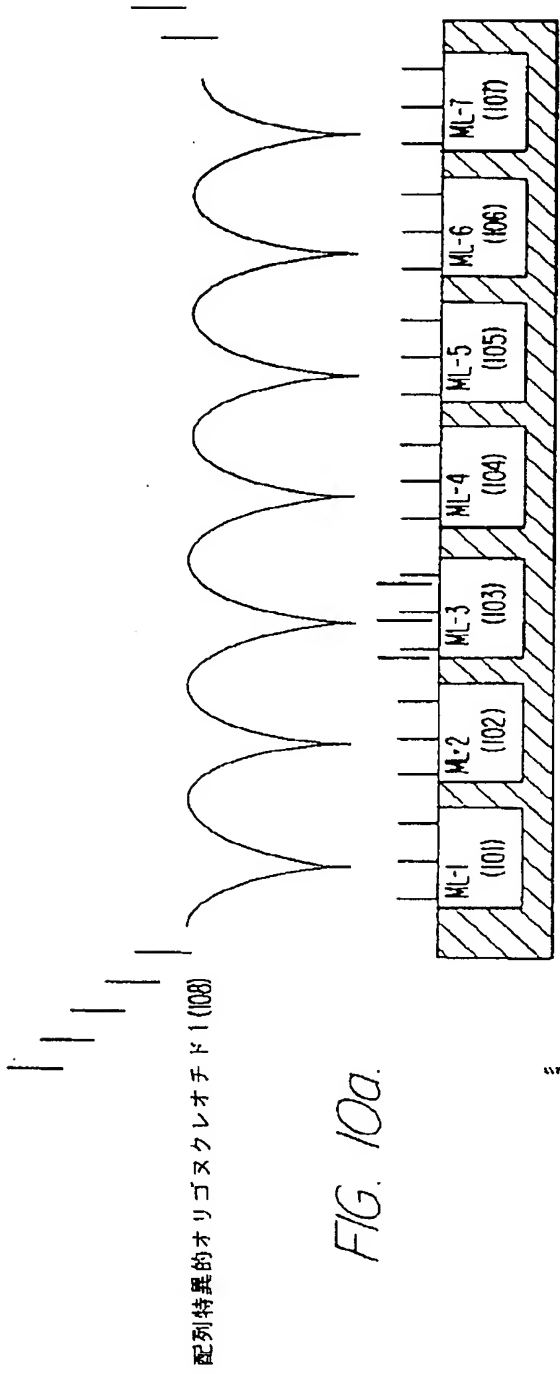


【図9】





【図10】



【図11】

FIG. 11a.

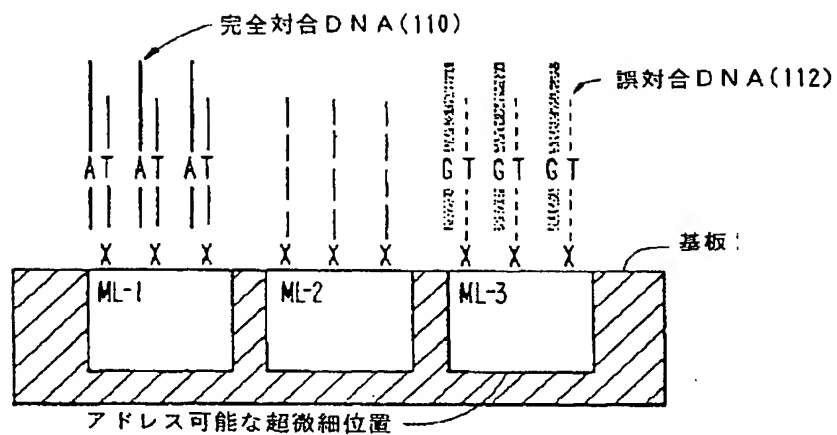


FIG. 11b.

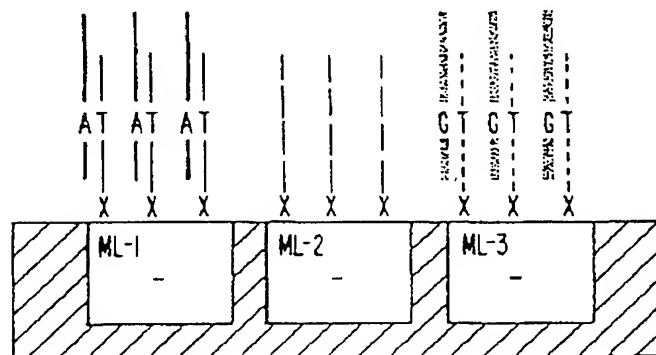
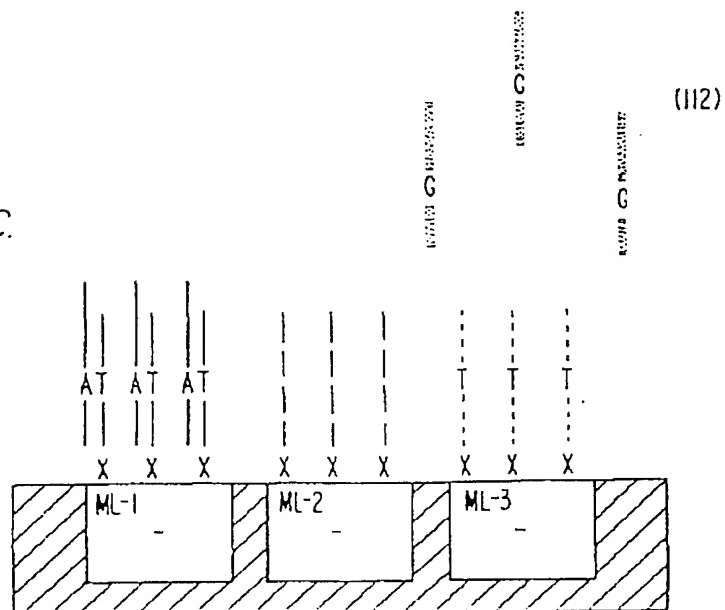


FIG. 11c.



【図12】

FIG. 12a.

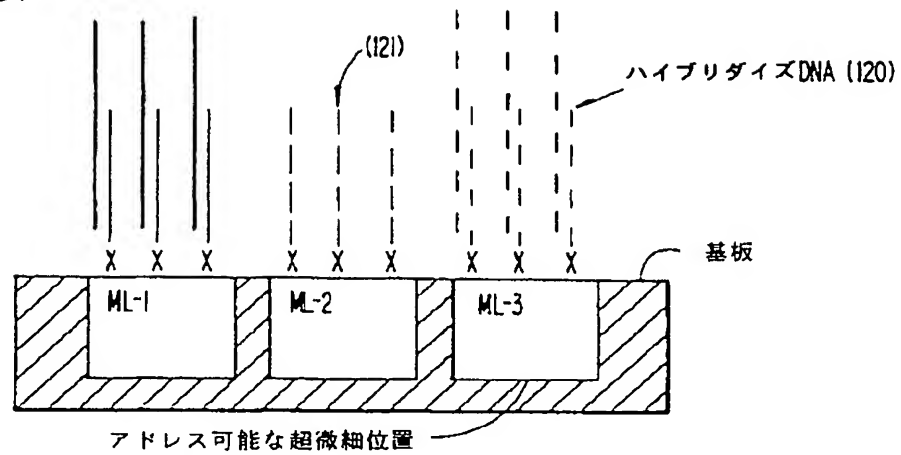
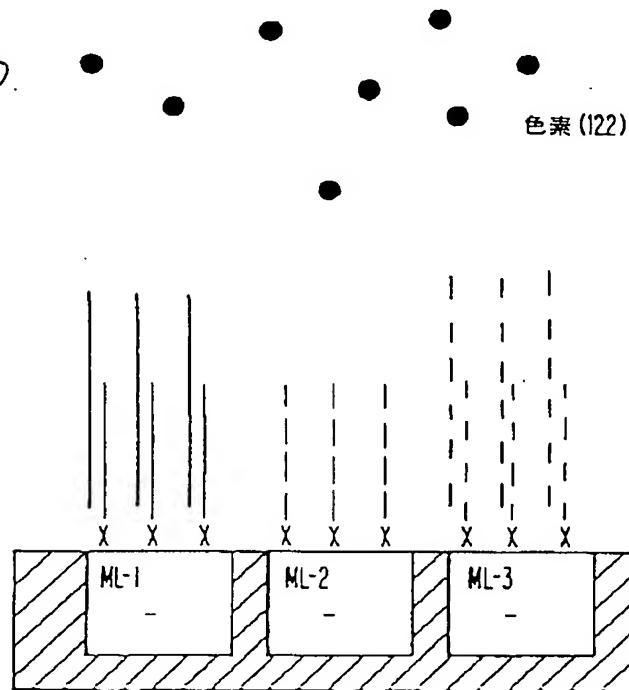


FIG. 12b.



【図12】

FIG. 12c.

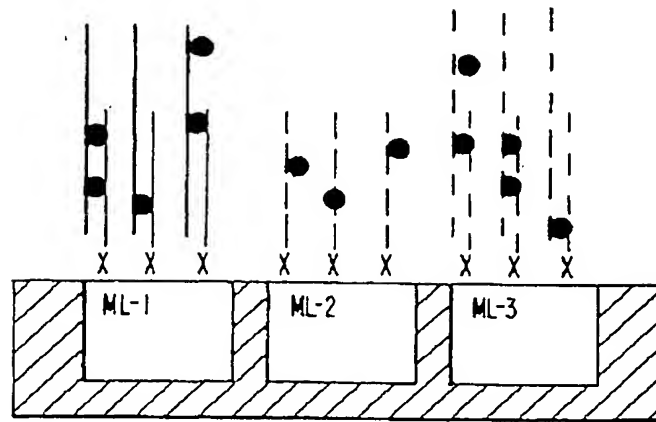
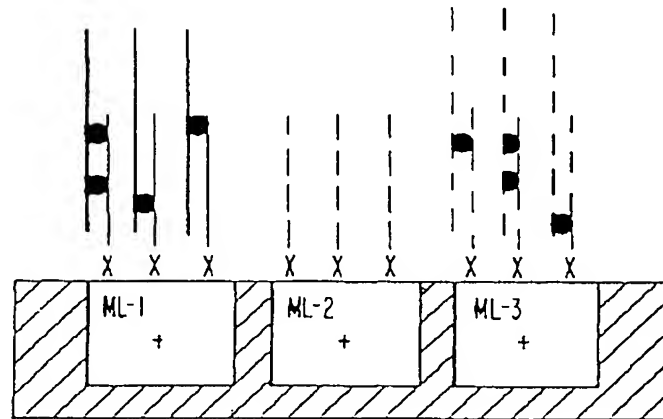


FIG. 12d.



【図13】

FIG. 13a.

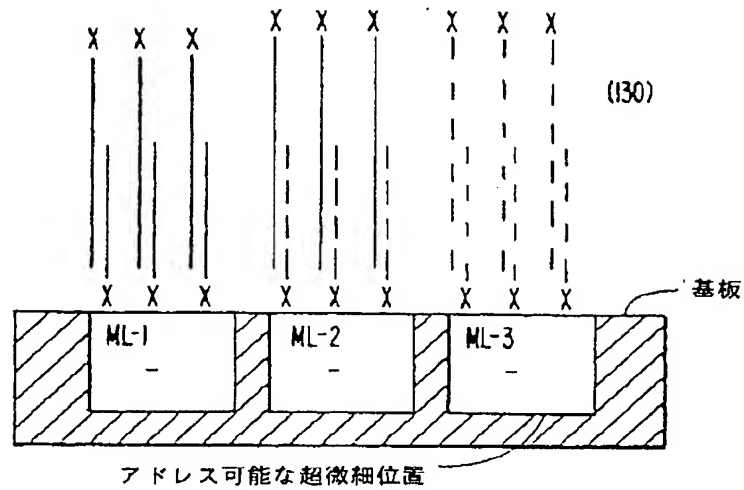
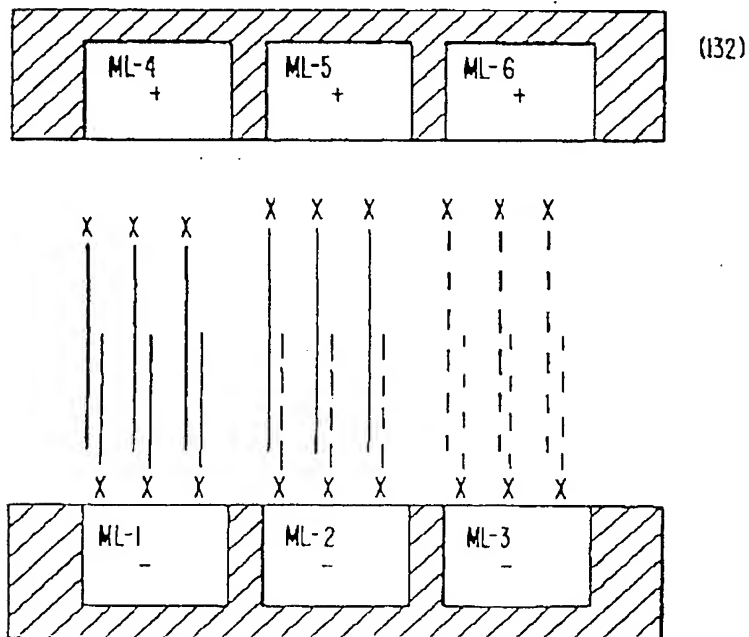
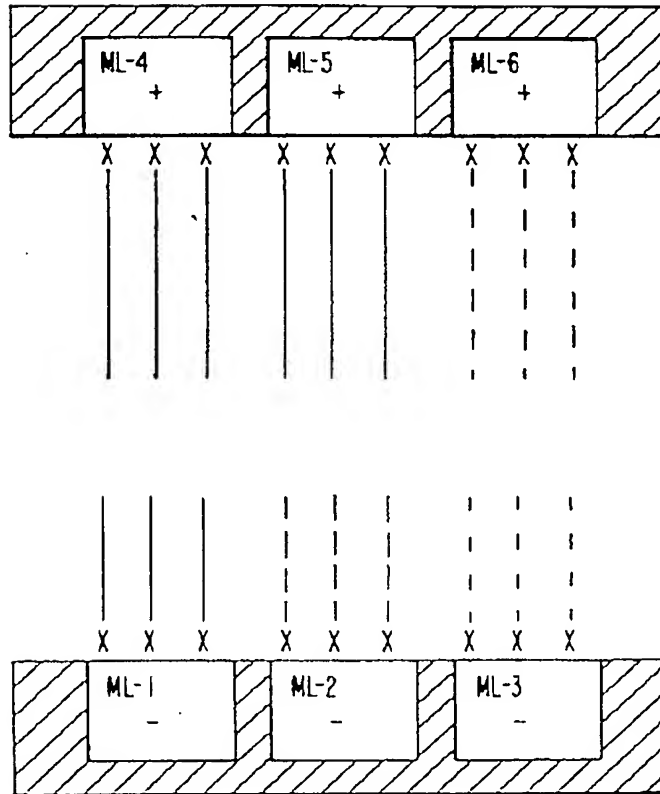


FIG. 13b.



【図13】

FIG. 13c.



【図14】

FIG. 14a.

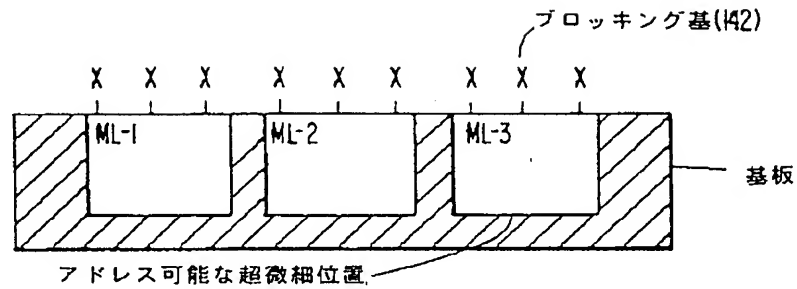


FIG. 14b.

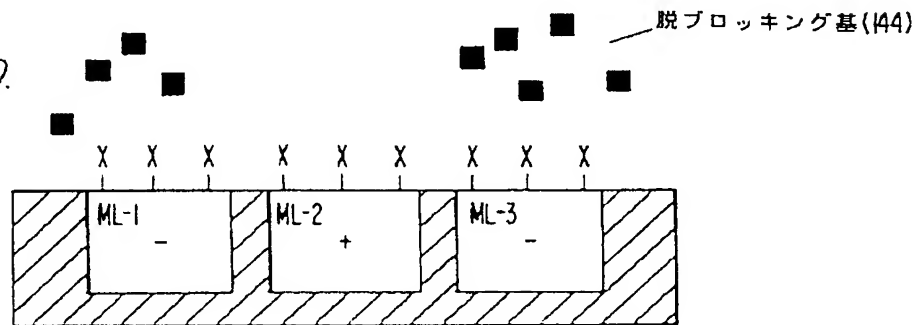
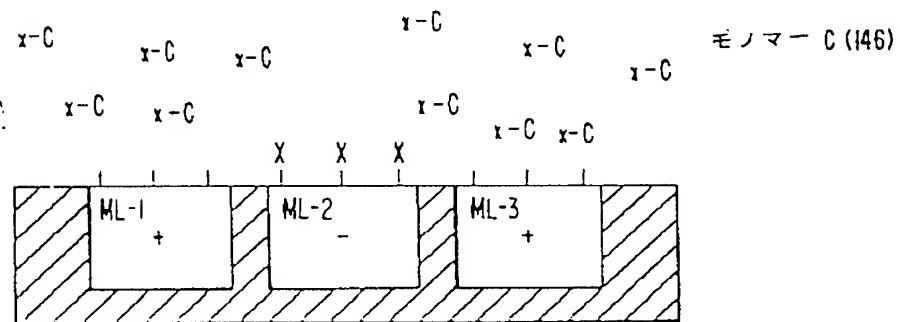


FIG. 14c.



【図14】

FIG. 14d.

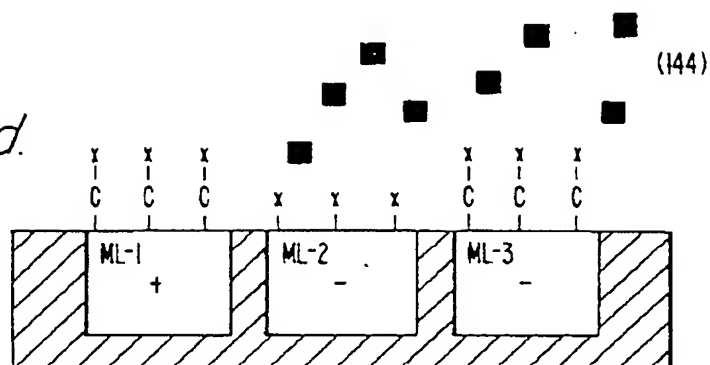


FIG. 14e.

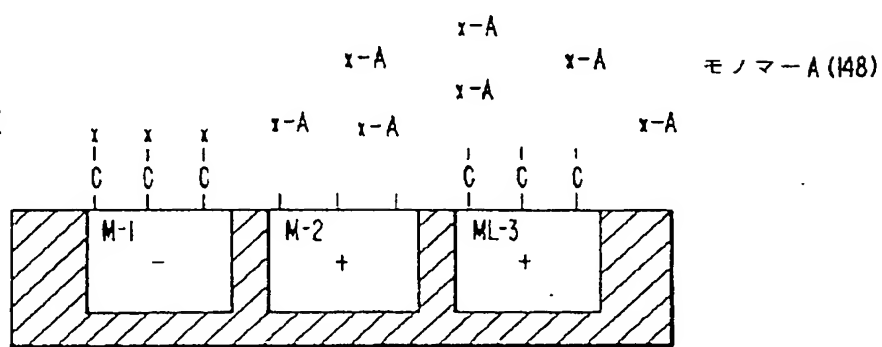
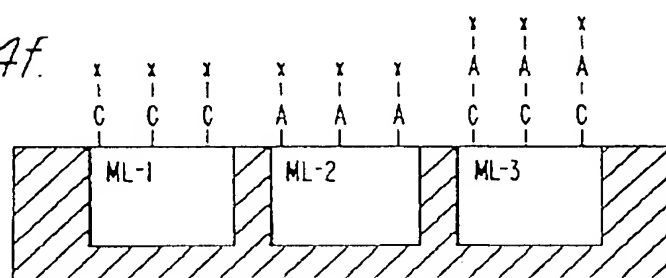
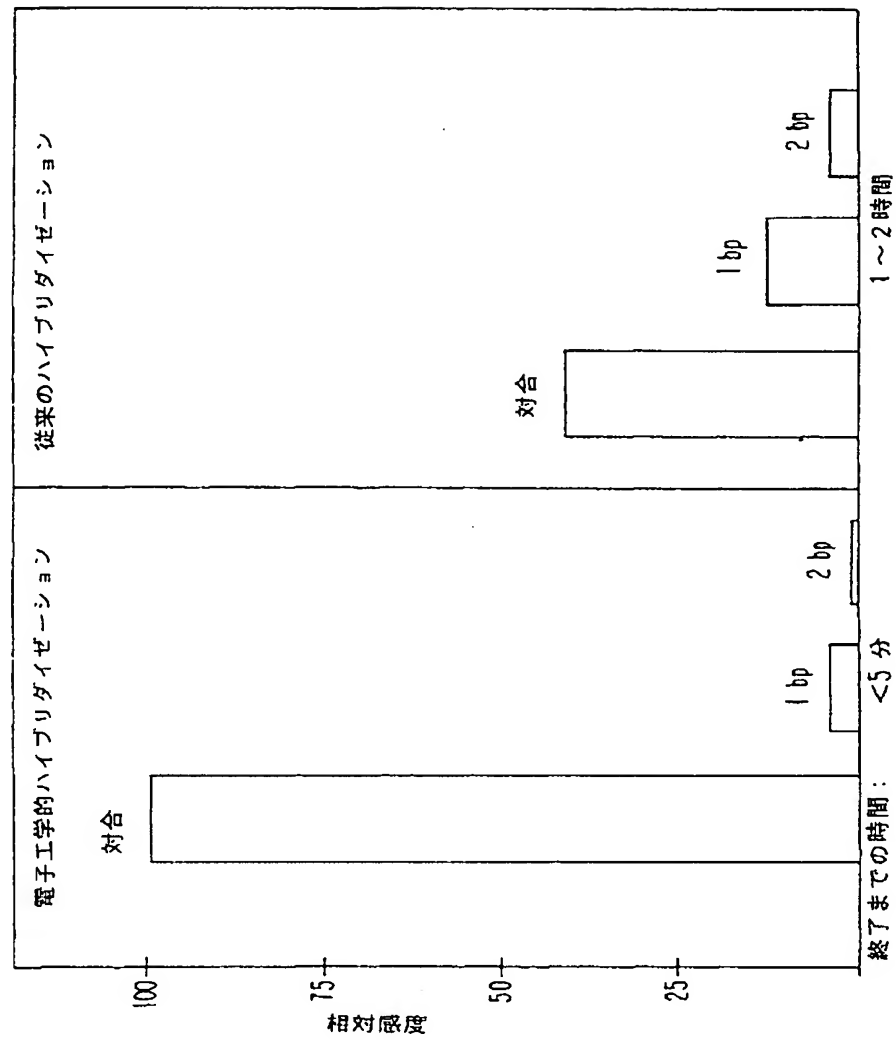


FIG. 14f.

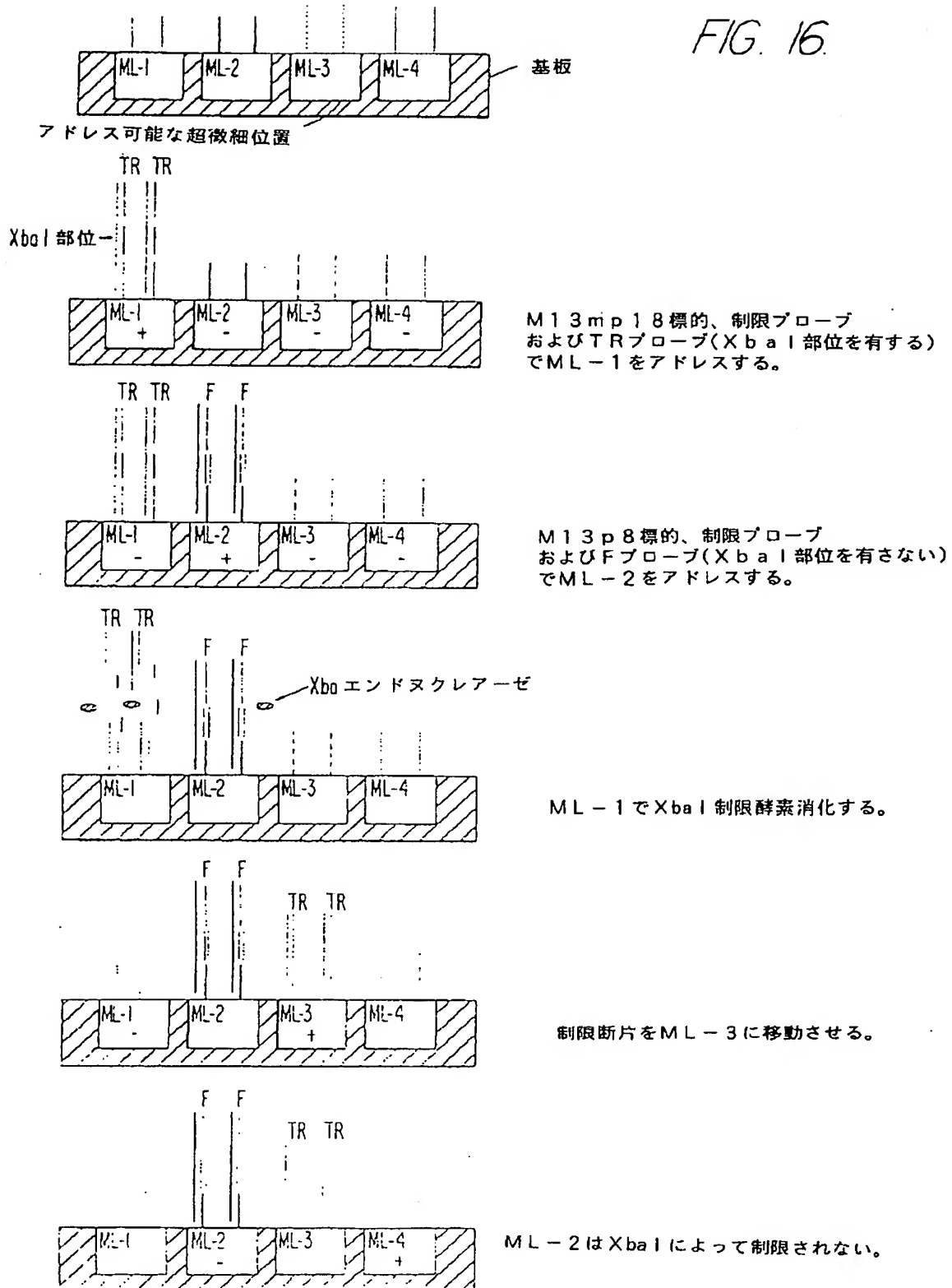




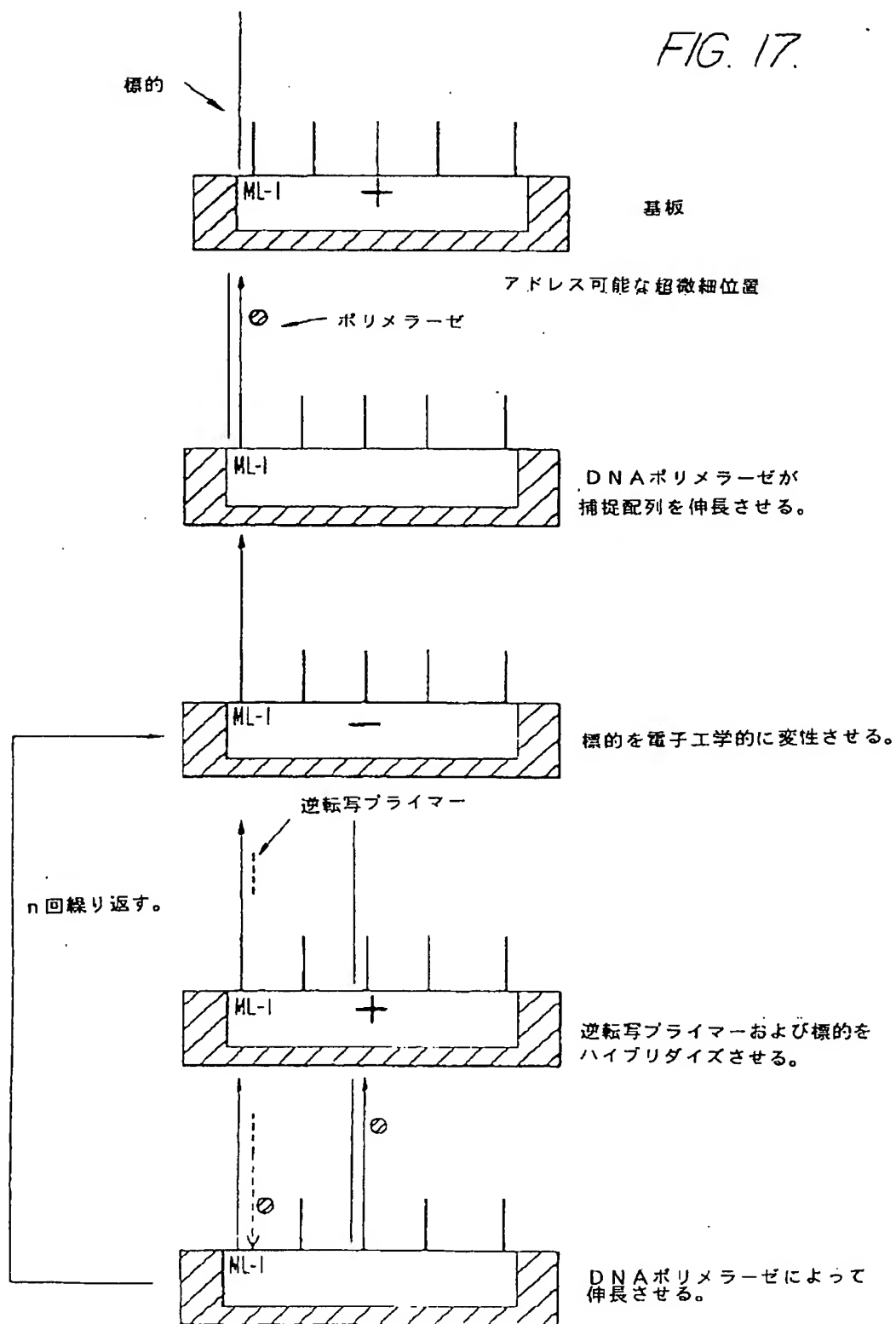
【図15】



【図16】



【図17】



【図18】

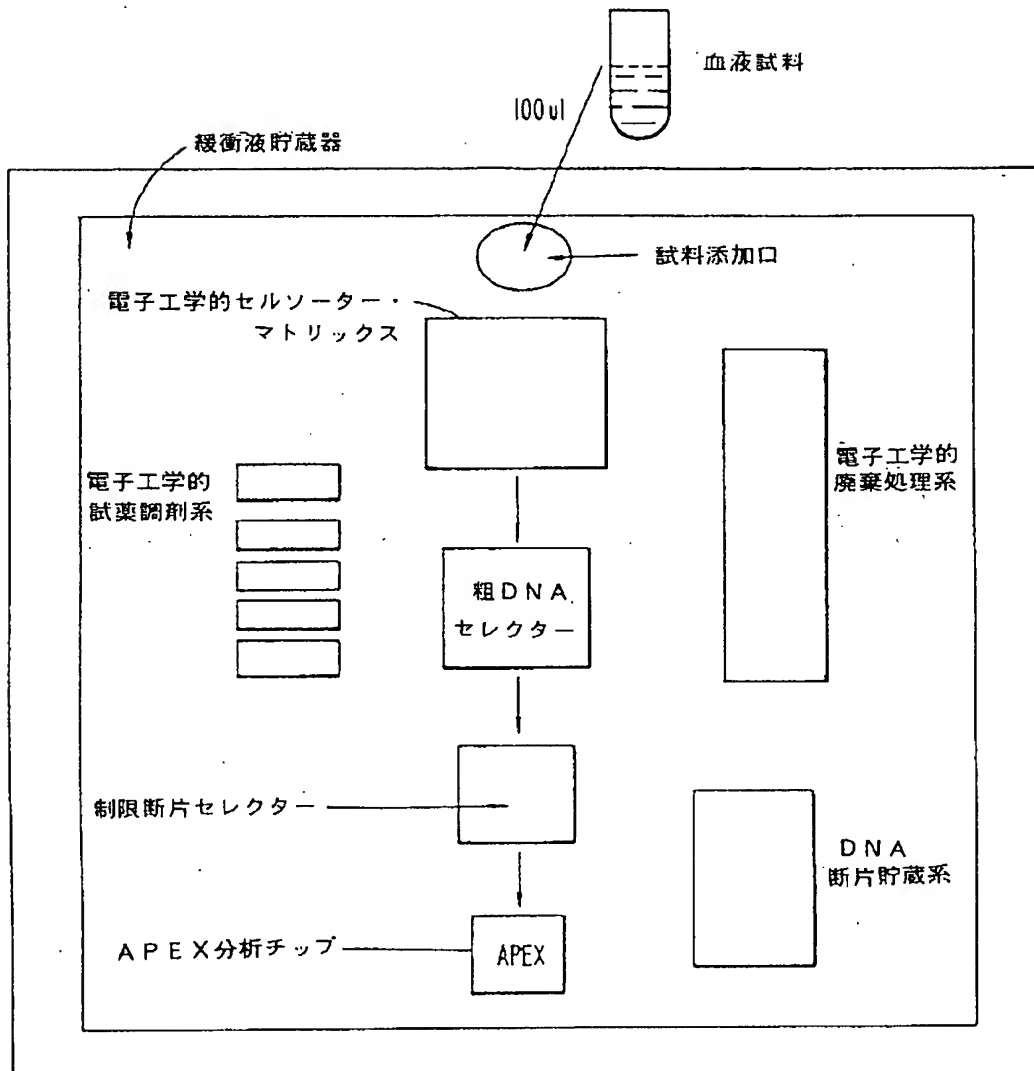


FIG. 18.

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US95/08570

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : C07H 21/00  
US CL : 536/25.3

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 422/50,68.1; 435/6,91.1,91.2,810; 536/22.1,23.1,24.1,24.3,24.31,24.32,24.33,25.3

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, CAS, MEDLINE, WPI, BIOTECH ABS, BIOSIS  
search terms: biosensor, electrode?, biochip?, chip?, hybridize?, complementary, DNA

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	US, A, 5,096,807 (LEABECK) 17 MARCH 1992, see claims 1-48 therein.	1-6, 9-11, 13, 14, 17-20, 22- 25, 28-31, 56- 58, 64, 65, AND 67 ----- 26, 27, AND 61-63

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, each combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

29 SEPTEMBER 1995

Date of mailing of the international search report

13 OCT 1995

Name and mailing address of the ISA/US  
Commissioner of Patents and Trademarks  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

ARDIN MARSCHKE

Telephone No. (703) 308-0196

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US95/08570

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ---- Y	US, A, 5,227,265 (DEBOER ET AL.) 13 JULY 1993, see especially figures 2, 7, 8, and 10, and claims 5 and 13.	1-6, 9-11, 13, 14, 17-20, 22-25, 28-31, 56-58, 64, 65, AND 67 ----- 26, 27, AND 61- 63
X ---- Y	US, A, 5,234,566 (OSMAN ET AL.) 10 AUGUST 1993, see especially the abstract, the figures, example 5, and claims 1-38 therein.	1-11, 13, 15-28, 56-60, 64, 65, 67, 68, 70-72, 92, AND 93 ----- 12, 14, 29-31, AND 61-63
A	US, A, 5,304,487 (WILDING ET AL.) 19 APRIL 1994, see the entire disclosure.	1-94
Y	US, A, 5,200,051 (COZZETTE ET AL.) 06 APRIL 1993, see especially claim 17 regarding aminopropyltriethoxysilane permeation layer.	2 AND 12
X ---- Y	US, A, 5,063,081 (COZZETTE ET AL.) 05 NOVEMBER 1991, see entire disclosure.	1-9, 14-28, 30, AND 31 ----- 10-13, 29, AND 32-94
Y	US, A, 3,995,190 (SALGO) 30 NOVEMBER 1976, see especially the figures and the summary of the invention in columns 4-5.	1-94

---

 フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I		
G O 1 N 33/566		0275-2 J	G O 1 N 27/30		3 3 1 Y
// C 1 2 N 15/09	Z N A	0275-2 J		27/46	A
		9162-4 B	C 1 2 N 15/00		Z N A A
(72)発明者 エバンス, グレン・エイ					
アメリカ合衆国95093テキサス州、プラノ、					
ミートル・ビーチ・ドライブ6504番					
(72)発明者 ソスノウスキー, ロナルド・ジイ					
アメリカ合衆国92118カリフォルニア州、					
コロナド、アデラ・アベニュー1013番					

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成14年11月19日（2002. 11. 19）

【公表番号】特表平9-503307

【公表日】平成9年3月31日（1997. 3. 31）

【年通号数】

【出願番号】特願平8-504426

【国際特許分類第7版】

G01N 27/327

C12Q 1/68

G01N 27/27

27/333

33/50

33/566

// C12N 15/09 ZNA

【F I】

G01N 27/30 351

C12Q 1/68 A

G01N 33/50 P

33/566

27/30 357

331 Y

27/46 A

C12N 15/00 ZNA A



## 手続補正書

平成14年 6月11日

特許庁長官殿

1. 事件の派生

平成08年特許願第504426号

2. 補正をする者

名称 ナノゲン、インコーポレイテッド

3. 代理人

住所 〒540-0001  
大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 I M Pビル  
南山特許事務所  
電話 (06) 5949-1261  
FAX (06) 5949-0361

氏名 弁護士 (6214) 青山 浩



4. 補正可能な範囲

請求の範囲

5. 補正対象項目名

請求の範囲

6. 補正の内容

別紙の通り

試料を該複数の位置と接触させ;

該複数の位置の各々において遺伝子配列の不存在または存在を検出することによって該試料の遺伝子プロファイルを決定する工程を含むことを特徴とする電子工学的に制御された遺伝子をタイプ分けする方法。

1.1. 電極を含む電子工学的にアドレス可能な位置を供し;

基質を該位置と接触させ;

該位置を酵素に対して反対の電荷に置き、それにより、該酵素を該位置に濃縮し;

該基質を該位置に付着させ;

該酵素を該位置と接触させ;

該位置を該酵素と反対の電荷に置き、それにより該酵素を該位置に濃縮し;

該酵素を該位置の該基質と反応させる工程を含むことを特徴とするアドレス可能な位置において電子工学的に制御された酵素反応を行う方法。

1.2. 該基質が核酸を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

1.3. 該酵素が制限酵素、リガーゼ、プロテイナーゼ、グリコシダーゼまたはホスホリラーゼを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

1.4. 該酵素がDNAポリメラーゼを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

1.5. 該酵素がRNAポリメラーゼを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

1.6. 該酵素反応が核酸の酵素消化を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

1.7. 該酵素反応が核酸の合成を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

1.8. 該酵素反応がポリペプチドの合成を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

(別紙)

請求の範囲

1. 各々が電極を含む複数の電子工学的にアドレス可能な位置; および該複数の位置の各々に付着した結合物質を含む。

ここに、該結合物質の各々は遺伝子配列の存在を検出できることを特徴とする遺伝子タイプ分けのための自己アドレス可能な電子デバイス。

2. 該遺伝子配列がヌクレオチド配列である請求項1記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

3. 該ヌクレオチド配列がcDNA配列である請求項2記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

4. 該ヌクレオチド配列がゲノムDNA配列である請求項2記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

5. 該ヌクレオチド配列がmRNA配列である請求項2記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

6. 該ヌクレオチド配列がcRNA配列である請求項2記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

7. 該遺伝子配列がアミノ酸配列である請求項1記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

8. 各々の該複数の位置に結合する各々の該結合物質が同一である請求項1記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

9. 該結合物質がもう1つの該結合物質とは異なる請求項1記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

10. 各々が電極よりなる複数の電子工学的にアドレス可能な位置を供し;

結合物質を該複数の位置の各々に付着させ、ここに、該結合物質の各々は遺伝子配列の存在を検出でき;

1.9. (1) 電極を含む電子工学的にアドレス可能な位置を供し;

(2) 該位置に付着したオリゴヌクレオチドプライマーYを供し;

(3) 一本鎖核酸Xを該位置と接触させ、ここに、該プライマーYは該核酸Xに特異的にハイブリダイズし;

(4) 該位置を該核酸Xに対して反対の電荷に置き、それにより、該位置に該核酸Xを濃縮し、該核酸Xを該プライマーYにハイブリダイズさせ;

(5) 該核酸ポリメラーゼを該位置と接触させ;

(6) 該位置を該核酸ポリメラーゼに対して反対の電荷に置き、それにより、該核酸ポリメラーゼを該位置に濃縮し、該核酸ポリメラーゼが該位置で該プライマーYから該核酸Yを合成するのを可能とし;

(7) 該位置を十分な時間、偏の電位に置いて、該核酸Xを該位置から除去し;

(8) オリゴヌクレオチドプライマーXを該位置と接触させ、ここに、該プライマーXは該核酸Yに特異的にハイブリダイズし;

(9) 該位置を該プライマーXに対して反対の電荷に置き、それにより、該プライマーXを該位置に濃縮し、該プライマーXを該核酸Yにハイブリダイズさせ;

(10) 該位置を該核酸ポリメラーゼと反対の電荷に置き、それにより、該核酸ポリメラーゼを該位置に濃縮し、それにより、該核酸ポリメラーゼが該位置の該プライマーXから該核酸を合成するのを可能とする工程を含むことを特徴とする核酸の電子工学的に制御された増幅を行う方法。

# SELF-ADDRESSABLE SELF-ASSEMBLING MICROELECTRONIC SYSTEMS AND DEVICES FOR MOLECULAR BIOLOGICAL ANALYSIS AND DIAGNOSTICS

**Publication number:** JP9503307T

**Publication date:** 1997-03-31

**Inventor:** HELLER MICHAEL J (US); TU EUGENE (US); EVANS GLEN A (US); SOSNOWSKI RONALD G (US)

**Applicant:** NANOGEN INC (US)

**Classification:**

**- International:** *G01N33/53; B01J19/00; B01L3/00; B82B3/00; C07H21/00; C07K1/04; C12N15/09; C12Q1/68; G01N27/27; G01N27/327; G01N27/333; G01N37/00; G11C13/02; G11C19/00; H01L21/336; H01L21/98; H01L29/78; G01N33/53; B01J19/00; B01L3/00; B82B3/00; C07H21/00; C07K1/00; C12N15/09; C12Q1/68; G01N27/27; G01N27/327; G01N27/333; G01N37/00; G11C13/02; G11C19/00; H01L21/02; H01L21/70; H01L29/66; (IPC1-7): C12N15/09; G01N27/327; C12Q1/68; G01N27/27; G01N27/327; G01N27/333; G01N33/50; G01N33/566*

**- European:** B01J19/00C; B01J19/00R; B01L3/00C6M; C07H21/00C4; C07K1/04B; C12Q1/68B; C12Q1/68B2; C12Q1/68B2H; C12Q1/68B10A; G11C13/02; G11C19/00; H01L21/336H1L; H01L21/336H6C; H01L21/336W; H01L21/98; H01L29/78F2; Y01N2/00; Y01N4/00

**Application number:** JP19950504426T 19950705

**Priority number(s):** WO1995US08570 19950705; US19940271882 19940707

**Also published as:**

 WO9601836 (A1)  
 EP0717749 (A1)  
 JP2007020568 (A)  
 FI961034 (A)  
 EP0717749 (A4)

more >>

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP9503307T

Abstract of corresponding document: **WO9601836**

A self-addressable, self-assembling microelectronic device is designed and fabricated to actively carry out and control multi-step and multiplex molecular biological reactions in microscopic formats. These reactions include nucleic acid hybridizations, antibody/antigen reactions, diagnostics, and biopolymer synthesis. The device can be fabricated using both microlithographic and micro-machining techniques. The device can electronically control the transport and attachment of specific binding entities to specific micro-locations. The specific binding entities include molecular biological molecules such as nucleic acids and polypeptides. The device can subsequently control the transport and reaction of analytes or reactants at the addressed specific micro-locations. The device is able to concentrate analytes and reactants, remove non-specifically bound molecules, provide stringency control for DNA hybridization reactions, and improve the detection of analytes. The device can be electronically replicated.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

1. Substrate;

An electrode and this electrode are supported by this substrate.;  
current source; connected with this electrode possible [ actuation ] -- and -- the adhesion layer which adjoined this electrode -- becoming -- the molecule which it can insulate this electrode here although this layer is permeability to a counter ion, or can be combined with it at it -- receiving -- permeability -- not but -- and it is characterized by the ability of this layer to adhere to a macro molecule -- electronic -- device in which the self-address is possible.

2. Electron device according to claim 1 with which it consists of an osmosis layer further, and this osmosis layer is prepared between this adhesion layer and this electrode.

3. Electron device according to claim 1 with which this current source consists of source of direct current.

4. Electron device according to claim 1 which consists of member chosen from group which this substrate becomes from silicon, glass, silicon dioxide, plastics, and ceramic.

5. Electron device according to claim 1 with which this substrate consists of insulating material which exists the base and on it.

6. Electron device according to claim 5 which is member chosen from group which this base becomes from silicon, glass, silicon dioxide, plastics, and ceramic.

7. Electron device according to claim 5 with which this base consists of silicon.

8. Electron device according to claim 5 with which this insulating material consists of silicon dioxide.

9. Electron device according to claim 1 with which this substrate consists of circuit pattern or circuit board.

10. The electron device according to claim 1 to which this electrode can move an electrification macro molecule to this adhesion layer.

11. this electrode moves simultaneously the 1st macro molecule which carried out electrification to this adhesion layer -- it can make -- and -- this -- the electron device according to claim 1 which can remove the 2nd macro molecule which has a reverse charge to the 1st macro molecule from this adhesion layer.

12. The electron device according to claim 2 with which this osmosis layer consists of aminopropyl triethoxysilane.

13. Electron device according to claim 2 which consists of a buffer-solution reservoir prepared between this osmosis layer and this electrode further.

14. The electron device according to claim 1 with which adhesion in this adhesion layer of this macro molecule does not insulate this electrode.

15. The electron device according to claim 1 which consists of an ingredient chosen from the group which this electrode becomes from aluminum, gold, silver, tin, copper, platinum, palladium, carbon, and a semiconductor material.

16. The electron device according to claim 1 which consists of an ingredient chosen from the group which this electrode becomes from aluminum, gold, silver, tin, copper, platinum, palladium, carbon, and a semiconductor material.

17. The electron device according to claim 1 with which the adhesion of a cementing material to this adhesion layer does not insulate this electrode.

18. Substrate;

Each of two or more electrodes and this electrode is prepared on this substrate.;

current source; connected with these two or more electrodes possible [ actuation ] -- and -- the adhesion layer which adjoined this each electrode -- becoming -- the molecule which it can insulate this each electrode here although this layer is permeability to a counter ion, or can be combined with it at it -- receiving -- permeability -- not but -- and it is characterized by the ability of this layer to adhere to a macro molecule -- electronic -- device in which the self-address is possible.

19. Electron device according to claim 18 which consists of a switch controller which connects this current source with these two or more electrodes further.

20. Electron device according to claim 18 which consists of an osmosis layer prepared between this adhesion layer and this each electrode further.

21. The electron device according to claim 18 which consists of an ingredient chosen from the group which this each electrode becomes from aluminum, gold, silver, tin, copper, platinum, palladium, carbon, and a semiconductor material.

22. Electron device according to claim 18 which consists of an electronic insulating material formed between the electrodes of further this plurality.

23. The electron device according to claim 18 with which these two or more electrodes have been arranged in an array.

24. Electron device according to claim 18 which consists of a mold cavity for holding the solution which consists of matter further chosen from the group which consists of a cementing material, a reagent, and analyte.

25. The electron device according to claim 18 which forms the active location device by which the specific binding matter was selectively conveyed to the joint location in which these two or more addresses are possible, was combined with it, and the address was carried out.

26. The electron device according to claim 18 which it is while the width of face of the joint location on a device is 0.5 micrometers and 200 micrometers.

27. The electron device according to claim 18 which it is while the width of face of the joint location on a device is 5 micrometers and 100 micrometers.

28. The electron device according to claim 18 with which these two or more joint locations are arranged in the 2-dimensional array.

29. The electron device according to claim 18 with which these two or more joint locations are arranged in the three-dimension array.

30. Electron device according to claim 18 with which it consists of computer system and this system is connected further here electronically in these two or more joint locations.

31. The electron device according to claim 30 with which this computer system is connected with this electrode.

32. Offer Location Connected with Power Source.;

; Contact the 1st nucleic acid to the 2nd nucleic acid, and adhere to this 2nd nucleic acid here in this location, and it ranks second to it. Although it consists of putting this location on sufficient time amount and electronegative potential, and this 1st nucleic acid will be removed from the 2nd nucleic acid here if this 1st nucleic acid is a nonspecific nucleic-acid array to this 2nd nucleic acid How to control electronically the nucleic-acid hybridization characterized by consisting of a process which will not be removed if this 1st nucleic acid is a specific nucleic-acid array to this 2nd nucleic acid.

33. The approach according to claim 32 this 1st nucleic acid and this 2nd nucleic acid exist in a solution.

34. The approach according to claim 32 of consisting of a process which puts this location on electropositive potential further before putting this location on electronegative potential, and condenses this 1st nucleic acid in this location by that cause.

35. or [ raising this electronegative potential for every constant value ] -- or the method according to claim 32 of making it fall.

36. The approach according to claim 32 this \*-specific nucleic-acid array has one mispairing to the array of this 2nd nucleic acid.

37. The approach according to claim 32 this 1st nucleic acid consists of seven or less nucleotide.

38. The approach according to claim 32 this 1st nucleic acid consists of 22 or more nucleotides.

39. The approach according to claim 32 this 1st nucleic acid consists of a nucleotide between 7 and 22.

40. The approach according to claim 32 of consisting of an element which can detect this 1st nucleic acid.

41. The approach according to claim 32 this 1st nucleic acid consists of fluorophore.

42. The approach according to claim 41 chosen from the group which this fluorophore becomes from Texas Red and a fluorescein.
43. The approach according to claim 32 this 1st nucleic acid consists of deoxyribonucleotide.
44. The approach according to claim 32 this 1st nucleic acid consists of ribonucleotide.
45. The approach according to claim 32 this 1st nucleic acid consists of a qualification nucleotide.
- 46.; Add a color further detectable in this solution, and combine that it is also at compatibility higher than a single strand nucleic acid here with a double strand nucleic acid, and this color ranks second. The approach according to claim 33 of consisting of a process which measures the level of the hybridization between the 1st nucleic acid and this 2nd nucleic acid in this location by detecting the level of this color in this location.
47. The approach according to claim 46 this color consists of an ethidium bromide.
- 48.; Add a color further detectable in this solution, and this color emits the signal in which strong detection is possible here by the case where a double strand nucleic acid is contacted rather than a single strand nucleic acid, and ranks second to it. The approach according to claim 33 of consisting of a process which measures the level of the hybridization between this 1st nucleic acid and this 2nd nucleic acid in this location by measuring the level of the signal in which this detection of this color in this location is possible.
49. The approach according to claim 48 this color consists of an ethidium bromide.
50. The approach according to claim 33 this solution consists of the 3rd nucleic acid which consists of a nonspecific nucleic-acid array to this 2nd nucleic acid.
51. The approach according to claim 50 the concentration of this 3rd nucleic acid exceeds 1,000 times of the concentration of this 1st nucleic acid.
52. The approach according to claim 32 this 1st nucleic acid consists of a nucleotide of 7.
53. The approach according to claim 32 this 1st nucleic acid consists of a nucleotide between 5 and 7.
54. The approach according to claim 32 this 1st nucleic acid consists of a nucleotide of 22.
55. Offer Location Connected with Power Source.;
- Two or more nucleic acids are contacted to a target nucleic acid, and this location adheres to this target nucleic acid here.;
- It ranks second. How to control electronically the nucleic-acid hybridization characterized by consisting of putting this location on sufficient time amount and electronegative potential, and consisting of a process which removes a nonspecific nucleic-acid array from this target nucleic acid here not to a specific nucleic-acid array but to this target nucleic acid to this target nucleic acid from these two or more nucleic-acid arrays.
56. 1st Location Containing Electrode Which Exists Solution in 1st Bottom, and 2nd Location Containing Electrode Which Exists in 2nd Bottom are Contacted -- Making --; -- Subsequently -- This 1st Location is Put on Electric Electrification Matter and Reverse Charge to this 2nd Location. Thereby How to condense electronically the electric electrification matter which consists of a process which condenses this electrification matter not in this 2nd location but in this 1st location.
57. The approach according to claim 56 of consisting of a process which puts this 2nd location on the same charge to this matter further.
58. The approach according to claim 56 of consisting of a process which makes covalent bond form between this matter and an adhesion layer in this 1st location further.
59. The approach according to claim 56 by which this matter is a nucleic acid and electrification of this 1st location is carried out with electropositive potential.
60. The approach according to claim 59 by which electrification of this 2nd location was carried out with electronegative potential.
61. The approach according to claim 56 the concentration of this matter in this 1st location exceeds 10 times of the thing of this matter in this 2nd location.
62. The approach according to claim 56 the concentration of this matter in this 1st location exceeds 1,000 times of the thing of this matter in this 2nd location.
63. The approach according to claim 56 the concentration of this matter in this 1st location exceeds 106 times of the thing of this matter in this 2nd location.
64. The approach according to claim 56 of consisting of a process which makes this matter adhere to this 1st location further.
65. Contact Solution in 1st and 2nd Locations.;
- ; Put this 1st location on the electric electrification matter and a reverse charge to this 2nd location, by

that cause, convey this electrification matter to this 1st location, and rank second. This 2nd location is put on the charge of the objection to this electrification matter to this 1st location after an appropriate time [ ]. By that cause How to convey the electrification matter in a solution electronically from the 1st location characterized by consisting of a process which conveys a nucleic acid to this 2nd location from this 1st location to the 2nd location.

66. The approach according to claim 65 this matter is a nucleic acid.

67. The approach according to claim 65 of consisting of a process which makes this matter adhere to this 2nd location further.

68. Offer Two or More Reaction Locations on Substrate, and Address is Electronically [ Separately ] Possible for Each Reaction Location Here.;

An adhesion layer is formed on each reaction location.;

These two or more reaction locations are contacted in the solution which consists of an electrification monomer A.;

Specified A location where Reaction A occurs with a reverse charge to Monomer A is deflected selectively, another location where Reaction A does not occur in the same charge as Monomer A is deflected, and, thereby, Monomer A is made to condense and react to these A locations.;

After an appropriate time, the unreacted monomer A is removed from these two or more reaction locations.;

These two or more reaction locations are contacted in the solution which consists of an electrification monomer B.;

How to control a biopolymer electronically by two or more locations characterized by to consist of a process which make deflect another location where Reaction B does not occur in the same charge as Monomer B, make these A locations condense Monomer B by that cause, make to make deflect selectively these A locations in the charge of objection of Monomer B, and react, and obtains dimer A-B, and compound it in them.

69. The approach according to claim 68 this monomer A consists of a nucleotide, and this monomer B consists of a nucleotide.

70. The approach according to claim 68 this monomer A consists of amino acid, and this monomer B consists of amino acid.

71. Offer Complementary Array to Specific Nucleic-Acid Array, and Make this Specific Nucleic-Acid Array to which Address of [ on Master Device ] was Carried Out Hybridize this Complementary Sequence.;

; With the location where the address of [ on this master device ] was carried out, arrange the location where the address of [ on the electron device in which the acceptor self-address is possible ] is not carried out, and rank second. The location on this negative master device and the location on this forward acceptor device are deflected. By that cause How to reproduce the electron device by which the address was carried out in the specific nucleic-acid array characterized by consisting of a process which conveys this complementary sequence to the location where this address of [ on this acceptor device ] is not carried out and in which the master self-address is possible.

72. How to reproduce the patternized array according to claim 71 which consists of a process which offers the chaotropic agent or modifier which carried out electrification of the complementary sequence from master mold to forward [ which can denaturalize ] further.

73. location; in which the address is possible on two or more electronics targets with which each consists of an electrode -- and -- the cementing material adhering to each of two or more of these locations -- becoming -- Electron device in which the self-address for the gene type division characterized by the ability of each of this cementing material to detect existence of a gene sequence here is possible.

74. The electron device this whose gene sequence is a nucleotide sequence and in which the self-address according to claim 73 is possible.

75. The electron device this whose nucleotide sequence is a cDNA array and in which the self-address according to claim 74 is possible.

76. The electron device this whose nucleoside array is a genomic DNA array and in which the self-address according to claim 74 is possible.

77. The electron device this whose nucleotide sequence is a mRNA array and in which the self-address according to claim 74 is possible.

78. The electron device this whose nucleotide sequence is a cRNA array and in which the self-address according to claim 74 is possible.

79. The electron device this whose gene sequence is an amino acid sequence and in which the self-address according to claim 73 is possible.
80. The electron device in which the self-address according to claim 73 where this each cementing material combined with these two or more locations of each is the same is possible.
81. The electron device with which this cementing material differs from this another cementing material and in which the self-address according to claim 73 is possible.
82. Each Presents Two or More Electronics Targets Which Consist of an Electrode with Location in which Address is Possible.;
- A cementing material is made to adhere to each of two or more of these locations, and each of this cementing material can detect existence of a gene sequence here.;
- A sample is contacted in these two or more locations.;
- How to carry out the type division of the gene which is characterized by consisting of a process which determines the gene profile of this sample by detecting un-existing or existence of a gene sequence in each of two or more of these locations and which was controlled electronically.
83. Present Electronics Target Which Consists of an Electrode with Location in which Address is Possible.;
- A substrate is contacted in this location.;
- This location is put on a reverse charge to an enzyme, and this condenses this enzyme in this location.;
- This substrate is made to adhere to this location.;
- This enzyme is contacted in this location.;
- This location is put on this enzyme and a reverse charge, and this condenses this enzyme in this location.;
- How to perform the enzyme reaction electronically controlled in the location which is characterized by consisting of a process to which this enzyme is made to react with this substrate of this location, and in which the address is possible.
84. The approach according to claim 83 this substrate consists of a nucleic acid.
85. The approach according to claim 83 this enzyme consists of a restriction enzyme, a ligase, proteinase, glycosidase, or a phosphorylase.
86. The approach according to claim 83 this enzyme consists of DNA polymerase.
87. The approach according to claim 83 this enzyme consists of RNA polymerase.
88. The approach according to claim 83 this enzyme reaction consists of enzyme digestion of a nucleic acid.
89. The approach according to claim 83 this enzyme reaction consists of composition of a nucleic acid.
90. The approach according to claim 83 this enzyme reaction consists of composition of a polypeptide.
- 91.(1) Present the electronics target which consists of an electrode with the location in which the address is possible.;
- (2) Offer the oligonucleotide primer Y adhering to this location.;
- (3) Contact the single strand nucleic acid X in this location, and this primer Y hybridizes it specifically to this nucleic acid X here.;
- (4) Put this location on a reverse charge to this nucleic acid X, and this condenses this nucleic acid X in this location, and make this primer Y hybridize this nucleic acid X.;
- (5) Contact nucleic-acid polymerase in this location.;
- (6) Put this location on a reverse charge to this polymerase, and this condenses this polymerase in this location, and enable this polymerase to compound a nucleic acid Y from this primer Y in this location.;
- (7) Put this location on sufficient time amount and electronegative potential, and remove this nucleic acid X from this location.;
- (8) Contact an oligonucleotide primer X in this location, and this primer X hybridizes it specifically to this nucleic acid Y here.;
- (9) Put this location on a reverse charge to this primer X, and this condenses this primer X in this location, and make this nucleic acid Y hybridize this primer X.;
- (10) The approach put this location on the charge of this polymerase and objection, this condenses this polymerase in this location, and this performs magnification controlled like lightning study of the nucleic acid which consists of a process which enables this polymerase to compound a nucleic acid from this primer X of this location.
92. 2nd Macro Molecule is Contacted in 1st Macro Molecule Which Carried Out Electrification in Direct-Current Electric Field -- Making -- Here -- this -- 2nd Macro Molecule is Combined with

Location -- Having --;

this location -- sufficient time amount -- this -- the charge of the 1st macro molecule -- receiving -- reverse potential -- placing -- here -- this -- the 1st macro molecule -- if -- this -- the 1st macro molecule -- this, although it is removed from this 2nd molecule if it does not combine with the 2nd macro molecule specifically if -- this -- the 1st macro molecule -- this -- the approach of performing association electronically controlled between the macro molecules characterized by consisting of a process which will not be removed if it combines with the 2nd macro molecule specifically.

93. this -- the approach according to claim 92 the 1st macro molecule is a polypeptide.

94. this -- the approach according to claim 92 the 1st macro molecule is a nucleic acid.

---

[Translation done.]



**\* NOTICES \***

**JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**


---

**[Detailed Description of the Invention]**

The self-assembly micro electronic system in which the object for molecule biological analysis and the self-address for a diagnosis are possible, and field of device invention This invention relates to the design of the self-assembly micro electronic system which can perform actively two or more processes and the compounded reaction in a microscope format and in which the self-address is possible, manufacture, and an activity. Especially, the molecule biological reaction like nucleic-acid hybridization, nucleic-acid magnification, sample preparation, an antibody / antigen reaction, a clinical diagnosis, and biopolymer composition is included in these reactions.

Background of invention Molecular biology consists of a wide range technique for analysis of a nucleic acid and protein, and many of them form the foundation of clinical diagnostic assay. On these techniques, nucleic-acid hybridization analysis, restriction enzyme analysis, Separation and purification of gene sequence analysis, a nucleic acid, and protein are included. for example, Jay Sambrook (J. Sambrook), I EFU flysch (E. F.Fritsch), and tee Maniatis (T. Maniatis) -- "-- molecular cloning: -- A laboratory manual (Molecular Cloning:A Laboratory Manual)" -- the 2nd edition New York State, the Cold Spring Harbor Laboratory press (Cold Spring HarborLaboratory Press) company of a cold spring harbor (Cold Spring Harbor, New York), 1989.

Operating a huge number per very many samples is included in many molecule biological techniques. Often they are complicated, and take time amount, and, generally a high precision is required. As for many techniques, the application is restricted by lack of sensibility, singularity, or repeatability. For example, the problem accompanying sensibility and singularity restricted practical application of nucleic-acid hybridization, and came until now.

Generally detecting a small number of specific target nucleic acid (DNA or RNA) with a probe dramatically out of the non-target nucleic acid of a large quantity is included in nucleic-acid hybridization analysis. In order to maintain high singularity, hybridization is usually performed under the strictest conditions attained with the various combination of temperature, a salt, a detergent, a solvent, the chaotropic agent, and a modifier.

Nucleic-acid hybridization analysis of two or more samples it has been carried out in the form of various filters and a solid-state base material (G ray BERUTSU et al. (G. A.Beltz) --) The 100th volume (Methods in Enzymology) of Methods in Enzymology B section, The volume Earl Wu (R. Wu), El Grossman (L. Grossman), and on cay mol dub (KMoldave), New York (New York), Academic Press (Academic Press), Chapter 19, 266 - 308 pages, 1985. Making it hybridize with the probe (group) which was made to carry out the noncovalent bond of the target DNA to a filter, and carried out the indicator of this by radioisotope succeedingly is included in one format and the so-called "dot blot" hybridization. "Dot blot" hybridization has acquired the wide range application. many versions were developed (em El em Anderson (M. L.M.Anderson) and BII Dee Young (B. D.Young) --) "Nucleic-acid hybridization-practical approach The volume" BII dee Hermes (B. D.Hames) and for S Jay Higgins (S. J.Higgins), (Nucleic Acid Hybridization-A Practical Approach) Refer to Washington, D.C. (Washington D.C.), an AIARUERU press (IRL Press) company, Chapter 4, 73 - 111 pages, and 1985. "Dot blot" hybridization is further developed also the object for multiplex analysis of genome mutation (dee NANIBU pretty (D. Nanibhushan) and Dee Rabin (D. Rabin), July 8, 1987, Europe patent application No. 0228075), the object for detection of a duplication clone, and for genome map production (G ray Evans (G. A.Evans), June 15, 1993, U.S. Pat. No. 5,219,726).

To another format and the so-called "sandwiches" hybridization covalent bond of the oligonucleotide

probe is carried out to a solid-state base material, and catching and detecting two or more nucleic-acid targets using it subsequently is included (em RANKI et al. (M. Ranki) --) The 21st volume (Gene) of a gene, 77 - 85 pages, 1983; Ray em Pulver (A. M. Palva), Tee em RANKI (T. M. Ranki) and EICHI I sow DARUNDO (H. E. Soderlund), October 2, 1985, British patent application GB2156074A No.; Tee em RANKI (T. M. Ranki) and EICHI I sow DARUNDO (H. E. Soderlund), January 7, 1986, U.S. Pat. No. 4,563,419; Ray dee BII Malcolm (A. D. B. Malcolm) and Jay ray Laon Dale (J. A. Langdale), July 3, 1986 and PCT WO 86/03782; Wye SUTABIN skiing (Y. Stabinsky), January 14, 1988, U.S. Pat. No. 4,751,177; Tee EICHI Adams et al. (T. H. Adams), February 22, 1990, PCT WO 90/01564; R BII WARASU et al. (R. B. Wallace), The 11th volume (Nucleic Acids Res.) of NUKUREIKKU ASHIZZU research, 3543 pages, 1979; and BII Jay Connor et al. (B. J. Connor), The 80th volume (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) of the pro C DINGUZU OBU National Academy of Sciences Inn U.S.A., 278 - 282 pages, 1983. The compound version of these formats is called "the reverse dot blot (reverse dot blot)."

Even when using the reporter radicals (the enzyme, the fluorescence chromophore, radioisotope, etc.) and joint detection systems of high sensitivity (fluoro meter, RUMINO meter, a photon counter, scintillation counter, etc.) most using the latest nucleic-acid hybridization format and the latest strict control approach, it is still difficult to detect the nucleic-acid target of low copy number (namely, one to 100,000 pieces).

This difficulty is caused by some problems produced in relation to direct probe hybridization. One problem relates to strict control of a hybridization reaction. A hybridization reaction is usually performed under strict conditions, in order to attain the singularity of hybridization. Optimization of the temperature in hybridization, ionic strength, and a modifier and the continuing cleaning method are contained in the approach of strict control in first meaning. If these strict conditions are applied, a remarkable reduction of the number of the hybridization probe / target complex for detecting will take place to a regrettable thing.

Another problem relates to DNA in most samples, especially a human genome DNA sample being dramatically complicated. When a sample consists of a huge number very similar to a specific target sequence of arrays, even the most unique probe array starts the partial hybridization of a \*-target sequence and a large number.

The 3rd problem relates to the hybridization dynamics which is not [ between a probe and its specific target ] desirable. As for a great portion of hybridization reaction, even the bottom of the best condition is relatively performed by a low-concentration probe and a low-concentration target molecule. In addition, a probe often competes with the complementary strand to a target nucleic acid.

The 4th problem about the hybridization format of current most is the \*-specific background signal of a high level. This is caused when a DNA probe almost has compatibility to any matter.

these problems -- each -- or it combines and the sensibility and/or the singularity of nucleic-acid hybridization of said format are made to lose Since it is required for the clinical diagnostic assay on the basis of most nucleic acids to detect the nucleic-acid target of low copy number, this is regrettable.

Since it is difficult to detect the nucleic-acid target of low copy number, the research community is greatly dependent on the polymerase chain reaction (PCR) for making a target nucleic-acid array amplify (em ray INISU et al. (M. A. Innis), "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Academic Press (Academic Press), 1990). Even if, even if it requires a long period of time however and is a troublesome process, the continuing direct nucleic-acid-probe technique is improved according to a huge number of target nucleic-acid arrays produced by the PCR reaction.

The characteristic exception over the general difficulty of detecting the target nucleic acid of low copy number with a direct probe is the Inn SAICHU hybridization technique. A nucleic-acid array with unique low copy number is detectable in each cell with this technique. In the Inn SAICHU format, a target sequence is automatically restricted to the field of a cell (- 20 -50 micrometer<sup>2</sup>) or a nucleus (- 10 micrometers<sup>2</sup>) by comparatively high partial concentration. furthermore, a probe / target hybridization signal is restricted to a field different microscopically and morphologically -- having --; -- an electropositive signal is easily distinguishable from a signal artificial or more nearly nonspecific than the hybridization on a solid-state base material with this.

By copying the Inn SAICHU hybridization in a certain kind of mode the new technique in which the compound equipment or matrix equipment (for example, DNA chip) formed [ overly ] into the detailed format performs multiplex sample nucleic-acid hybridization analysis is developed (em Bali Naga (M. Barinaga) --) Refer to the 253rd volume (Science) of Science, 1489 pages, 1991; W Baines (W. Bains)

and the 10th volume (Bio/Technology) of biotechnology/technology, 757 - 758 pages, and 1992. these approaches -- usually -- a DNA chip -- a specific DNA array is overly combined with the very small specific field of the solid-state base material like a detailed well. these hybridization formats -- the conventional "reverse dot blot" and a "sandwiches" hybridization system -- super- -- the version of a detailed scale -- it is .

If detailed format-ized hybridization is overly used, "sequencing by hybridization" (SBH) (refer to em Bali Naga (M. Barinaga), the 253rd volume (Science) of Science, 1489 pages, 1991; W Baines (W. Bains) and the 10th volume (Bio/Technology) of biotechnology/technology, 757 - 758 pages, and 1992) can be performed. SHB uses all possible n-nucleotide oligomer (n serious condition). Can identify n serious condition in a strange DNA sample, and it is continuously put in order by the algorithm analysis. a DNA array is produced (KURUKUBENJAKOFU (R. Crkvenjakov) R dahoma nak (R. Drmanac) and R -) Yugoslavia country patent application #570 / 1987 [ 87 or ]; R dahoma naks (R. Drmanac), The 4th volume (Genomics) of Genomics, 114 pages, 1989; SUTEREZOSUKA et al. (Strezoska), The 88th volume (Proc.Natl.Acad.Sci.USA) of pro C DINGUZU OBU National Academy of Sciences Inn U.S.A., 10089 pages, 1991; , an R dahoma nak (R. Drmanac) and R vehicle KUBENJAKOFU (R. B.Crkvenjakov) U.S. Pat. No. 5,202,231, April 13, 1993.

There are two formats in performing SBH. All possible n serious-condition arrays are produced on a base material, and, subsequently making this hybridize with a target sequence is included in one format. This is the version of a reverse dot blot. Another format is made to combine a target sequence with a base material, and having fished this one by one by all possible n serious condition is included in it. The dimorphism type has the further difficulty about the basic problem of direct probe hybridization, and compound hybridization.

Using the "Rivers dot blot" format for analyzing DNA or carrying out sequencing of the DNA is proposed in the Southern (Southern), the British patent application GB No. 8810400, 1988; the I em Southern et al. (E. M.Southern) and the 13th volume (Genomics) of Genomics, 1008 pages, and 1992. The Southern (Southern) identified known single point mutation using the genomic DNA which carried out PCR magnification. Moreover, the Southern has also indicated how to compound the array of an oligonucleotide on the solid-state base material for SHB. However, the Southern is not touching on how the optimal strict conditions are attained to each oligonucleotide on an array.

The DNA array is determined in FODORU et al. (Fodor), the 364th volume (Nature) of Nature, 555 - 556 pages, and 1993 using the array of the oligonucleotide of 8 serious condition of 1,024 on a solid-state base material. In this case, Target DNA was 12 serious-condition oligonucleotide of the single strand only containing A and C base which carried out fluorescent labeling. 12 serious-condition target sequence of 1pmol concentration (- 6x10<sup>11</sup> molecules) was required for hybridization with 8 serious-condition oligomer on an array. This result showed much mispairing. FODORU and others (Fordor) as well as the Southern was not mentioning the fundamental problem of the direct probe hybridization like the strict control about compound hybridization. These problems show that it is joined to the need for the simple 12 serious-condition target of a large quantity, and this SHB format is restricted considerably. Recently, sequencing of some brief (116bp) DNA arrays was carried out using the 2nd above mentioned format dahoma naks (Drmanac), the 260th volume (Science) of Science, 1649 - 1652 pages, and 1993. Target DNA made it combine with a film base material ("dot blot" format). Sequential hybridization was carried out with 10 serious condition and 11 serious-condition oligonucleotide to which 272 carried out the indicator of each filter. ; washing time amount by which the specific hybridization of a n serious-condition each probe was attained changed for 5 minutes - a night, and temperature at 0 degree C - 16 degrees C using extensive strict conditions. Most probes needed to wash for 3 hours at 16 degrees C. In order to detect a hybridization signal, the filter needed to be exposed for 2 to 18 hours. The target sequence was simple, and in spite of having used the strictest conditions that setting out of oligomer is decreased and can use it, the rate of false-positive hybridization of the total \*\*\*\* was 5%.

gold [ FO ] (Fodor) -- \*\* -- the oligonucleotide was compounded on the matrix the 251st volume (Science) of Science, 767 - 773 pages, and 1991 using the photograph plate technique. PIRUNGU et al. (Pirung), U.S. Pat. No. 5,143,854, and September 1, 1992 are teaching the large-scale photograph plate solid phase synthesis method of the polypeptide of the array format on a silicon substrate.

The minute drop containing a specific DNA array was made dropped [ overly ] at each micro-machining sample well on a glass base in another approach of matrix hybridization in BITIE et al. (Beattie) and "1992 San Diego board:gene recognition (The 1992 San Diego Conference:Genetic Recognition)" November, 1992 using a detailed robotics system. The hybridization in each sample well detects the

miniature electrode test fixed object which overly enclosed the minute well the each exception in alternating current (AC) electric field by sending an interrogation.

Irrespective of a format, DNA hybridization of a detailed scale and the approach of SHB have overly conquered no present fundamental problem relevant to a nucleic-acid hybridization reaction. They need the comparatively short single strand target sequence of a high level, or the PCR magnification DNA dramatically, and even the bottom of the strictest condition produces the false-positive hybridization signal of a high level. Even if it uses which conventional approach in the case of the compound format using the array of a brief oligonucleotide array, strict conditions cannot be optimized per array according to each. It is because temperature, ionic strength, or a modifier is changed or cannot be adjusted in the array or device used for these formats in the location according to individual as compared with other locations.

Therefore, common strict conditions must be used for all the arrays on a device.

By this, they are much \*\*. - Specific and partial hybridization arises and application of a device is limited dramatically. A problem becomes more complicated as the number of arrays with which it differs on an array increases, and array length decreases to ten or less serious condition or it increases to 20 or more serious condition. This is troublesome about especially SBH that needs many short chain oligonucleotide probes.

Different size, a charge, or the nucleic acid of a spacial configuration is separated in routine work by the electrophoresis technique in which a hybridization kind is distinguishable with those different mobility in electric field. Two or more surrounding electrode arrays of a medium (for example, gel) are used for pulse field electrophoresis. a very big DNA fragment inseparable depending on the conventional gel electrophoresis system is separated (Earl Anand (R. Anand) and the I em Southern (E. M. Southern) --) "the gel electrophoresis-practical approach (Gel Electrophoresis of Nucleic Acids-A Practical Approach) of a nucleic acid" -- the 2nd edition Refer to the volume Dee Rick Wood (D. Rickwood) and on BII dee Hermes (B. D. Hames), the AIARUERU press (IRL Press) company in New York (New York), 101 - 122 pages, and 1990.

It has indicated that a pace (Pace), U.S. Pat. No. 4,908,112, and March 13, 1990 produce a capillary tube gel electrophoresis system on a silicon substrate using a micro-machining technique. Two or more electrodes are built into this system, and move a molecule through the separation medium in this device. SOANE (Soane) and SOANE (Soane), U.S. Pat. No. 5,126,022, and June 30, 1992 will have indicated that linearity migration of the electrification molecule in mixture is controllable through the gel separation medium contained in tubing, if many electrodes are used.

In order to control migration of the molecule in a separation medium, and a location, an electrode must be installed in tubing.

DNA was turned in the direction of the electric-field train (line) produced in micro-machining inter-electrode using high-frequency alternating current (AC) electric field WASHIZU, an em (Washizu, M.) and KUROSAWA, the 6th volume (IEEE Transactions on Industry Applications) of OU (Kurosawa, O.) IEEE transactions-on industry applique SHONZU, 1165 - 1172 pages, and 1990. However, direct-current (DC) electric field cannot be used for those researches. Actuation of the cell which used duplex electrophoresis (dielectrophoresis), and a living thing molecule is indicated in WASHIZU (Washizu), the 25th volume (J. Electrostatics) of journal OBU erection ROSUTA tex, 109 - 123 pages, and 1990. A cell can be united and a living thing molecule can be oriented in accordance with the electric-field train produced [ overly ] with AC electrical potential difference between detailed-electrode structures. However, AC (1MHz) electrical potential difference of high frequency and the medium of low conductivity are vitally necessary for two electrophoretic processes. Although these techniques can orient the DNA molecule of different size in accordance with AC electric-field train, it cannot distinguish the hybridization complex comrade of the same size.

Huge trial has been made, in order to offer said effective technique of performing two or more processes and a compound molecule biological reaction so that more clearly. However, it was proved for the aforementioned reason that these techniques are insufficient. In spite of having recognized the want to an effective technique for a long time, the solution method satisfying until now is not advocated.

outline of invention the self-assembly which can perform actively a reaction two or more processes by which this invention was controlled in the microscope format, and compound and in which the self-address is programmable and possible -- it is overly related with the design of detailed electronic system and a device, manufacture, and an activity. Although it does not limit to these reactions, nucleic-acid hybridization and the molecule biological reaction of most like the clinical diagnosis related [ which is

related and antigen/ an antibody//reacts ] are included. in addition, although the device which carries out an application for patent can also perform combination biopolymer composition of many processes and is not limited to them, it is specific -- composition of the different oligonucleotide or different peptide in a minute location is overly included.

The device which carries out an application for patent is overly manufactured using both detailed lithography and a micro-machining technique. This device has and gets down from the matrix of the microscope location in which the address is possible to the front face, and the transport and association to itself of the matter (for example, a nucleic acid, an antibody) which overly combines a detailed location specifically according to each [ ; ] are controlled electronically, and can be specified. all -- the address is overly possible for a detailed location about those specific binding matter. If these devices are used, a self-assembly is possible for this system at the minimum external break in.

This address device can control various assays and reactions, and can perform them actively. either of the analyte or a reactant is specific by free field electrophoresis -- it can overly convey to a detailed-location, and the analyte or reactant is condensed efficiently there, and it reacts with the specific binding matter. The sensibility which detects the specific analyte or a specific reactant improves for the concentration effectiveness. Any \*-joint analyte or reactant is also removable by overly reversing the polarity of a detailed-location. In this way, the device concerned also improves assay and the singularity of a reaction.

the active property of this device -- each -- specific -- all the voice of the hybridization reaction (again -- it can creep -- that -- others -- a compatibility reaction) produced [ overly ] in a detailed-location -- the independent electronic control covered like is offered. The new device in which the hybridization reaction called electronic strict control (ESC) is influenced with these devices is offered. About the DNA-hybridization reaction which requires different strict conditions, the limitation of the conventional array technique which it originally has is conquered by ESC. The active device of this invention can make "different strict conditions" electronically in each \*\* detailed-location. In this way, all hybridization can be performed the optimal in the same bulk solution. These active devices differ from the conventional compound hybridization array and a DNA chip fundamentally. Although the conventional array has the different probe or different Target DNA located at least in each part, all on; array have the reaction or the strict conditions that temperature, the buffer solution, salt concentration, and pH were common. A reaction or any change in strict conditions influences at least all on this array. Although an array can be produced using the complicated photograph plate technique or a micro electronic detector element can be included in detection, passively, the conventional device controls an actual hybridization process, or does not affect it. The active device of this invention operates each \*\* detailed-location as the trial which became independent thoroughly, or an analysis part (that is, they form equivalent "test tube" in each location). A complex hybridization reaction can carry out by the minimum external physical actuation. In addition, in order to exchange the buffer solutions, it is not necessary to change temperature, and the need for the process which carries out multiple-times washing is lost.

In this way, at the device which carries out an application for patent, whole microprocessor control can perform many processes and the compounded reaction preferably by perfect and exact electronic control (that is, a computer performs). the device top which carries out the application for patent of many processes and the rate of the compounded reaction, singularity, and the sensibility -- each -- specific -- it is improved overly notably in a detailed-location.

Moreover, a device can detect easily the complex hybridized in each \*\* detailed-location by using the combined optical (fluorescence, chemistry luminescence, or spectrophotometric measurement) imaging detection system. The accumulation optoelectronics or the electronic sensing component which detects DNA directly is also incorporable into the body of a device.

By request, the master device by which the address was carried out by the specific binding nature matter can be electronically reproduced or copied to another base device.

which size which corresponds with the object of this invention, or a gestalt -- it can overly use also for a detailed-location. the desirable example of this invention -- setting -- the sub-millimeter range -- a detailed-location is overly used.

Generally the "specific binding matter" means the biological molecule or the synthetic molecule which has specific compatibility to other molecules, macromolecules, or cells through covalent bond or a noncovalent bond. Preferably, covalent bond or the organic-functions chemical groups (a primary amine, a SURUHI drill, aldehyde, etc.) which can carry out a noncovalent bond (automatically based on



qualification), a consensus sequence (nucleic acid), an epitope (antibody), hapten, or ligand is overly contained in the common functional group of a detailed-location front face in it at the specific binding matter. Although it does not limit, :deoxyribonucleic acid (DNA), a ribonucleic acid (RNA), an synthetic oligonucleotide, an antibody, protein, a peptide, lectin, a qualification polysaccharide, a cell, a synthetic compound giant molecule, the functional nano structure, a synthetic polymer, qualification / the blocked nucleotide/nucleoside, qualification / blocked amino acid, a fluorescence chromophore, a chromophore, ligand, a chelate, and hapten are contained in the specific binding matter.

"Strict control" means the capacity for a specific and nonspecific joint interaction to be distinguishable, by changing some physical parameters. In the case of nucleic-acid hybridization, temperature control is often used for strict nature. A reaction is performed the specific melting point ( $T_m$ ) of a double strand hybrid pair, or near the.

In this way, the first of this invention and the most important mode are devices which have electronically the array of the microscope location in which self-addressing is programmable and possible. the lower actuation nature direct current (DC) supported with a substrate by each microscope location -- a detailed-electrode is overly contained. The front face of each \*\* detailed-location has the osmosis layer to which a small counter ion is conveyed freely, and the adhesion layer in which the specific binding matter carries out share coupling. : (1) to which these unique design descriptions provide this device with the following important properties -- separate a compatibility reaction or a ligation reaction from the electrochemical reaction which occurs with maintainable [ overly maintainable / controllable functional DC electrode /-to detailed location down side;(2) electrophoresis-transport ], and (3) electrode (metal) interface, and a reverse electrolysis reaction. It is offering the electrophoresis-driving force which is used for these devices and with which the main function of a detailed-electrode overly turns a cementing material and reacting matter to a specific location.

An "array" or a "matrix" means the array of the location in which addressing on a device is possible. This location can be arranged by the 2-dimensional array, the three-dimensions array, or other matrix types. The number of locations can be made into the range to hundreds of thousands at least from some. Each location expresses the reactive site which became independent on the whole.

the 2nd voice -- it sets like and either of this invention on a device is specific in a cementing material -- let the approach overly of conveying to a detailed-location be the summary. If it activates, a detailed-location can overly also affect the free field electrophoresis-transport to itself of a functional specific binding body in which any carried out electrification. specific -- the specific binding matter functionalized when the detailed-location was overly contacted -- promptly -- the -- specific -- covalent bond is overly carried out to the adhesion layer front face of a detailed-location. A detailed-location can overly also be simultaneously protected by [ other ] maintaining them to reverse potential to an electrification molecule. This process is promptly repeatable until the address of the \*\*\*\* detailed-location is carried out by those specific binding nature matter.

The "electrification functionalization specific binding matter" is chemical reactivity (that is, covalent bond can be carried out to a location), and means being charged in net electrification (either + or -).

the 3rd voice -- it sets like and either of this invention on a device is specific -- the analyte or a reactant is made to condense in a detailed-location, and overly let the approach of making it react be the summary. after the specific binding matter adheres -- the lower part of each \*\* detailed-location -- a detailed electrode overly continues functioning in direct-current (DC) mode. any which are maintained by the reverse charge to this analyte or this reaction molecule according to this unique description in the comparatively thin electrification analyte or reactant molecule which separated in the solution are specific -- it can convey promptly, can condense and can be made overly to react in sequential or a parallel format also in a detailed-location specific -- a detailed-location can overly be protected or intercepted by maintaining it with the same charge as the analyte or a reactant molecule. These reaction rates in a detailed-location are notably accelerable overly with this capacity that condenses the selected analyte overly thin in a detailed-location or the selected reaction molecule.

if a desired reaction is completed, the potential of a detailed-electrode will overly be reversed -- making -- this -- the nonspecific analyte or an unreacted molecule is overly removable from a detailed-location. the specific analyte or a resultant -- any -- it can overly emit also from a detailed-location, can convey to other locations for the further analysis, can save in; or the location in which other addresses are possible, and can remove from; or this system thoroughly.

specific -- the analysis which the analyte in a detailed-location overly follows is also notably improved according to the capacity in which the nonspecific matter is made to \*\*\*\* from these locations.

the 4th voice -- like -- setting -- this invention: - hybridization happens -- specific -- super- -- a detailed-location (group) -- it is -- the thin target DNA and/or a probe DNA array -- quick -- condensing --;

- hybridization happened -- specific -- super- -- \*\* [ from a detailed-location (group) ] - the target DNA array combined specifically -- quick -- removing --;
- hybridization happened -- specific -- super- -- the complementary target DNA of a detailed-location (group) to competitiveness -- quick -- removing --;
- Adjust electronic strict control (ESC) and remove the DNA array (mismatching exceeding one base) hybridized selectively.;
- Adjust ESC and improve the analysis ability of the single mismatching hybridization using the probe of the range of 8 serious-condition - 21 serious condition. (for example, this identifies point mutation)
- Make the oligonucleotide point mutation probe (for example, a probe longer than 21 serious condition and a probe shorter than 8 serious condition) out of range used by the conventional approach hybridize efficiently using ESC.;
- ESC which became independent to each hybridization event which happens at the same temperature among the same bulk solution -- applying --; -- subsequently -- Let the approach of improving strict control of the nucleic-acid hybridization reaction which consists of a process which improves a non-amplifying target DNA array hybridizing to the array of a prehension oligonucleotide probe be the summary using -ESC.

In the 5th mode, this invention makes the summary the approach overly of carrying out combination composition of the biopolymer in a detailed-location.

In the 6th mode, this invention makes the approach of reproducing a master device the summary.

In the 7th mode, this invention makes the summary the device which performs electronically transport to preparation of a sample, and the analysis component of the device.

In the 8th mode, this invention makes the summary the device which carries out the delivery of a reagent and the reactant electronically, without using only the minimum fluid engineering.

In the 9th mode, this invention makes the summary the device which performs a molecule biological reaction and a DNA magnification reaction (for example, limit cutting reaction, DNA/RNA polymerase, and a DNA ligase target magnification reaction).

In the 10th mode, this invention makes the summary the device (for example, electronic restriction-fragment-length-polymorphism analysis and DNA fingerprint analysis) which makes a size decision electronically and can identify a restriction fragment.

In the 11th mode, this invention makes the summary the device which performs an antibody-antigen and an immunodiagnosis reaction.

In the 12th mode, this invention makes the summary the device which can perform combination composition of an oligonucleotide and a peptide.

In the 13th mode, it combines with a cell selectively, and this invention processes a cell into hybridization, and makes the summary the device which performs the Inn-SAICHU hybridization for DNA by ejection or intracellular from a cell.

It is the self which has the detection system [ be / optical and optoelectronics- / it / electronic ] with which this invention is related in the 14th mode. - It is the self which has the addressed micro electronics device or the detection system [ be / optical and optoelectronics- / it / electronic ] integrated. - Let the approach of detecting and analyzing the addressed reaction which overly occurs in a detailed-location be the summary using the addressed micro electronics device.

Since the device of this invention is a programmable electronic matrix (active programmable electronic matrices) actively, it uses an acronym "APEX", and indicates or shows the unique property of these devices. An APEX acronym is used for the both sides of the "chip" produced with micro lithography, and a micro-machining device.

With an APEX micro electronics device and the active property of a chip, the new device in which extensive various molecule biological reactions are performed can be created. The new method of attaining both the linearity of a target DNA molecule and an RNA molecule and an exponential increment, or magnification is included in these.

this device denaturalizes a DNA hybrid selectively in the common buffer solution of : (1) room temperature (for example, the Tm below quite), and exceeds; (2) 2 or it -- between detailed-locations, DNA is \*\*\*\*\* (ed) promptly, and is overly conveyed or moved, and the electronic mechanism of; and (3) requests which can make a specific reactant, a reagent, and an enzyme condense selectively is overly offered in a detailed-location. The new index [ physical / molecular biology- ] which

performs a target magnification mold reaction is contained in these [ all ].

The example of the molecule biological reaction controlled by many electronics targets is developed, and the electronic increment in the target DNA by electronic connection and increment; of the target DNA array by electronic increment; (4) DNA and RNA ligase of the target DNA by the electronic orientation restriction enzyme cutting; (2) electronic restriction fragment analysis; (3) DNA polymerase of a : (1) specific ds-DNA array and (5) RNA polymerase is included in these. These examples are the molecule biological reaction which can be performed on an APEX device, and the typical mold of an approach.

Probably, other summaries and advantages of this invention will be clear from the following detailed descriptions and claims.

easy explanation of a drawing three self-addressing produced using the micro lithography technique is possible for drawing 1 -- it is overly the sectional view of a detailed-location.

drawing 2 was produced in microphone RORISO graph -- it is overly the sectional view of a detailed-location.

drawing 3 is produced actually, and is addressed by the oligonucleotide, and 64 which was examined and in which self-addressing is possible is overly detailed -- it is the mimetic diagram of - location chip.

Drawing 4 shows like the specific adhesion chemistry fault to which the adhesion front face of a detailed-location is made overly to carry out covalent bond of the specific oligonucleotide promptly.

Drawing 5 is overly detailed. - It is the diagram of machined 96 which the detailed-location device overly extended.

Drawing 6 is overly detailed. - It is the sectional view of the machined device.

Drawing 7 shows the device of the device which overly uses the analyte or a reaction molecule for specific condensing electronically in a detailed-location.

Drawing 8 shows the assembly by which self-assignment of the device which has three specific oligonucleotide cementing materials (SSO-A, SSO-B, and SSO-C) was carried out.

Drawing 9 shows the hybridization process controlled by the electronics target of the sample / target DNA containing a specific DNA prehension array condensed [ overly ] in a detailed-location.

Drawing 10 shows the serial hybridization process specified electronically.

Drawing 11 shows electronic strict control (ESC) of the hybridization process which determines single point mutation.

Drawing 12 shows the scheme which detects hybridized DNA according to the fluorescent dye detection process controlled electronically, without using an indicator DNA probe.

Drawing 13 shows the scheme of the duplicate controlled by the electronics target of a device.

Drawing 14 shows the scheme of the combination composition to which the electronics target of an oligonucleotide pointed.

Drawing 15 shows the graph which compares the result of the 15 serious-condition Ras12 point-mutation hybridization performed using electronic strict control and the conventional technique.

Drawing 16 shows the electronics target of DNA the scheme of controlled restriction fragment cutting.

Drawing 17 shows the scheme of the magnification controlled by the electronics target of DNA which used DNA polymerase.

Drawing 18 shows the diagram of the APEX device designed so that sample preparation and DNA analysis might be performed.

Detailed description The device and the related methodology of this invention can perform a molecule biological reaction and a diagnostic reaction to the bottom of "perfect electronics control." The semantics of "electronic control" said to this invention is over the conventional original semantics of this word. A detailed electronic device, a device, and a detection system are overly level with idiomatic most which always exists under electronic control. The micro electronics device of this invention provides further not only idiomatic electronic control but a still more important thing with direct electronic control of the physical mode in which they perform a molecule biological reaction and a diagnostic reaction. The underlying concept of this invention is a micro electronics device which has the microscope location which it can be programmable and can be addressed. the induction-ized top face (namely, adhesion layer) where the specific binding matter carries out covalent bond of each \*\* detailed-location, a medium osmosis layer, and a lower direct current (DC) -- it overly has the detailed electrode. the this device after producing basic micro electronics structure first -- the specific binding nature matter -- each -- specific -- self-assignment of the addressing of a detailed-location can overly be carried out. In this semantics, this device carries out the self-assembly of itself. The device by which the self-address



was carried out continues, shifts and can perform a combination reaction actively at those two or more processes of the of overly each in a detailed-location. Although a device can react compound, an important advantage is that each reaction occurs equally by the trial part which became independent truly. The any are overly in a detailed-location, or a device can specify electronically and control quick migration and concentration of the analyte from there, and a reactant. According to the capacity of the device which controls the dynamic mode of various reactions electronically, many new devices, important advantages, and improving points are offered.

Three sections indicate the concept and example of this invention. The 1st section ("a design and processing" of a basic device) has indicated processing of this device that used the both sides of the design of a fundamental lower micro electronics device, micro lithography, and a micro-machine processing technique. The 2nd section "addressing by which self-assignment of the device was carried out" has indicated quick transport and adhesion of self-addressing of a device and a self-assembly, especially the specific binding matter to each \*\* detailed-location. The 3rd section "application of a device" has indicated what a device carries out electronics control of the compound reaction with which various two or more processes were combined. Moreover, this section has indicated the various applications of a device, and application.

I. A design and processing of a basic device In order to make two or more processes and a complicated reaction perform to a device, the electronic parts must be able to maintain active actuation in a water solution. in order to satisfy this requirement -- that the lower part of each \*\* detailed-location is controllable, and DC mode of functionality -- it must overly have the detailed-electrode. However, it is important for the device engine performance, especially sensibility (ratio of a signal to a noise) that a ligation reaction and a compatibility reaction are not influenced by the electrolysis reaction which occurs on activity DC electrode surface. although it is not what is limited to other consideration about a design and processing of a device -- the property of matter compatibility, the specific binding matter, the continuing reactant, and the analyte -- and the number of detailed-locations is overly contained.

-- controllable and DC mode of functionality -- it deflected to either [ which is operated in the direct-current mode (either continuation or a pulse) which influences one location of these devices, or free field electrophoresis transport from there or the sample solution in the specific join cementing material which carried out electrification in the format with overly controllable detailed electrode", a reactant, or the analyte, or can cause it ] forward or negative -- a detailed electrode is overly meant.

Within the limits of this invention, it does not depend for free field electrophoresis transport of a molecule on the electric field which are combined by the insulating material, or are restricted and made actually. It was required for the conventional electrophoresis separation technology for the electric-field train to be restricted by insulating (\*\*-conductivity) material, or to be shut up. the case of free field electrophoresis transport -- an electrification molecule -- one either overly else [ a detailed location to ] - - it overly moves to a detailed location, or specific from a bulk solution -- it overly moves to a detailed location. Therefore, the special arrangement or the special limit by the insulating material is not required for this mode of this invention.

little about two addresses are possible for a device -- super- -- a detailed location or about hundreds of thousands -- many -- it can design so that it may overly have a detailed location. Generally, many combinational devices which overly have a detailed location are processed using a micro lithography technique. Processing is performed on other suitable substrate ingredients like silicon or glass, a silicon dioxide, a plastic, or ceramic material. The design of such micro electronics "a chip" is the large-scale array or compound analysis device taken into consideration. A small number of device which overly has a detailed location or a macro location will be processed using a micro machine processing technique. the address is possible -- a detailed location can also be made into which configuration and can overly be preferably made into circular, a square, or a rectangle. Size of a detailed location can also be made into which size, and preferably, it is submicron (- 0.5 micrometers) - number cm (cm), and it is overly the size with 100 micrometers - 10 most desirablenm to the device which 5 micrometers - 100 micrometers are the most desirable range, and produces using a micro machine processing technique to the device in which the address is possible, and which is produced using a micro lithography technique. Probably, electron beam lithography, ion beam lithography, or the technique like molecule beam epitaxy will be required in order [ being smaller than the resolving power of the micro lithography method ] overly to produce a detailed location. Although a microscope location is desirable to application of analysis and a diagnostic mold, and it does not limit, to application like electronic dispensing of biopolymer composition of a preparative isolation scale, sample preparation, and a reagent, the location in which the

bigger address is possible, or a macro-location (for example, larger than 5mm) is desirable. after overly producing a detailed location by using micro lithography and/or a micro machine processing technique -- chemical modification and a polymerization reaction -- or it is still more alike and a special adhesion layer and an osmosis layer are made using a micro lithography processing technique. These important layers isolate a cementing material from the surface of metal of an electrode. these vital structures -- DC mode under each \*\* detailed location front face -- super- -- a detailed electrode -- a (1) specific (electrification) cementing material -- 1 -- super- -- a detailed location front face to others -- super- -- a detailed location front face -- or specific from a bulk solution -- whether free field electrophoresis transport in a detailed location is overly influenced or it can be caused and specific in;(2) specific-binding matter -- to a detailed location in the format by which covalent bond could be condensed and carried out to the front face embellished overly specially [ a detailed location ], and a reactant and the analyte besides; (3) were controlled [ overly ] Or after making the specific binding matter adhere so that it may be conveyed from there, making it able to function actively in DC mode can be continued, and it can avoid carrying out an adverse effect to; (4) electrochemical reaction and a ligation reaction with a product, or a compatibility reaction.

I (a) Design parameter (micro lithography) the self-address processed using the micro lithography technique is possible for drawing 1 -- the design development of a detailed location is overly shown. It is overly formed in the front face on three metal parts (12) as for which a detailed location (10), and (ML-1, ML-2, ML-3) have carried out deposition on an insulating material layer / substrate material. a metal part (12) -- the lower part -- it overly acts as detailed electrode structure (10). An insulating material isolates a metal part (12) mutually. Although it does not limit to an insulating material, a silicon dioxide, silicon nitride, glass, a resist, polyimide, rubber, plastics, or ceramic material is included. each which was made to form on the metal part (12) which produced drawing 2 with micro lithography - - the basic feature of a detailed location (10) is overly shown. the address is possible -- the detailed location was formed on the metal part (12), and has overly incorporated the oxidizing zone (20), the osmosis layer (22), the adhesion layer (24), and the cementing material layer (26). For covalent-bond coupling of an osmosis layer, a metal oxide layer offers the base. The metallic oxide known by this contractor of surface coating chemistry, hydroxyl (independent or combination), and other \*\* can offer the covalent-bond part where an osmosis layer is built or supported from there. It is not by any means indispensable that the osmosis layer is carrying out covalent bond to the metal-electrode front face actually. Physical duplication of osmosis material expresses the exception method which is within the limits of this invention.

by the osmosis layer, spacing offers between a surface of metal, adhesion, and a /cementing material layer -- having -- this -- a solvent molecule, a small counter ion, and electrolysis reactant gas -- from [ a surface of metal or there ] -- since -- it enables it to pass freely Although it does not limit to the osmosis layer material which can decrease disadvantageous effectiveness physically [ an electrolysis reaction ] and chemically, the iron complex to the oxidation reduction reaction prehension matter like palladium to H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, and a peroxide can be included. the thickness of the osmosis layer of the device produced with micro lithography -- about 1 nanometer (nm) - 100 micrometers (micrometer) can be most preferably made into the range of 2nm - 10 micrometers.

By the adhesion layer, the substrate for the covalent bond of a cementing material is offered. 0.5nm - 5 micrometers of thickness of the adhesion layer of the device produced with micro lithography can be most preferably set to 1nm - 500nm. This osmosis layer and an adhesion layer can be made to form in a certain kind of case from the same \*\*. The osmosis layer material of a certain kind which can be further activated for coupling of a cementing material is also included within the limits of this invention.

Covalent bond of the specific binding matter is carried out to an adhesion layer, and it forms a specific binding matter layer. Ideally, this specific binding matter layer is usually the specific binding molecule of a monolayer. However, in a certain case, this cementing material layer can have several layers or multilayer tie molecules.

A design of a certain kind and functional mode of an osmosis layer and an adhesion layer are directed with the property of physical (for example, size and a form) and a specific binding nature matter molecule. Moreover, they are overly continuously conveyed to a detailed location, and are directed to some extent by physical and chemical property of the reactant which will be combined with it, and an analyte molecule. without for example, an oligonucleotide cementing material causes loss of DC mode function -- one mold -- super- -- a detailed location front face -- it can adhere -- namely, this lower part - - in a detailed electrode, lower electrophoresis transport can overly still cause the free field

electrophoresis transport with other quick molecules from the front face to which the oligonucleotide affinity matter adheres, or there. However, when a big globular protein cementing material (for example, antibody) adheres to the front face of the same mold, they insulate a front face and can cause lowering or perfect loss of DC format function. Probably, suitable qualification of an adhesion layer must be performed so that the number of big cementing materials (for example, big globular protein) may decrease or between the cementing materials on a front face may be taken.

super- -- spacing between detailed locations -- the ease of production -- overly desirable [ on the requirements for the detection power between detailed locations, and equipment ] -- it is overly determined by the number of detailed locations. however, the point which can overly be operated on a perfect device field in any combination of a detailed location (overly [ Namely, the lower part ] detailed electrode) -- setting -- spacing of overly pinpointing between detailed locations -- or the spacial configuration or structure of a detailed location is not overly required for a device function. Or it is not actually required to confine a device or overly to isolate a detailed location thoroughly by the dielectric or insulating cutoff material,, either. This is because a specific molecule is moved selectively, and the pattern or dielectric boundary of the compound electronic field does not need to dissociate and does not need to fix or orient in one of inter-electrode space, or a medium. As for a device, this is attained by [ with the address possible for a specific binding molecule, the continuing analyte, and a reactant ] overly adhering to the front face of a detailed location. With the driving force of free field electrophoresis, transport in a detailed location is overly offered from quick and direct; of which electrification molecule between one on a device of locations, and a total location, or a bulk solution. However, what the device is probably surrounded for for the fluid container and the biohazard object must point out.

the number of detailed locations overly increases exceeding hundreds of pieces -- alike -- following -- this -- the complexity of the lower circuit of a detailed location overly also increases. In this case, the grouping pattern of a detailed location must overly be changed, and air clearance must also be made to increase-like [ proportionally ], or a double layer circuit can be produced to a basic device.

the address was carried out by the specific binding matter -- super- -- a detailed location -- in addition, the \*\* -analysis which offers other functions -- the detailed location and the macro location are overly included in this device -- I will come out. these -- a reagent can overly be saved using a detailed location or a macro location, a reactant, the analyte, or a cell can be saved temporarily, and it can use as a 1-time activity unit for other inhibition components in; and the reactant of an excessive amount, the analyte, or a sample (namely, a reagent dispensing system and a sample preparation system). other non-ADORUSU -- the address of the detailed location was overly carried out -- super- -- a detailed location -- combining -- using it -- these -- specific -- the reaction produced [ overly ] in a detailed location can be acted or influenced. these -- a detailed location is overly added to the activity between devices and in a device, and the both sides of control. It is also overly possible in a detailed location to interact and convey in this way between two devices which separated. The device which loads an actuation device by the cementing material or reactant from a preservation device, the device of sample preparation, and the device which copies and reproduces a device are offered by this.

Drawing 3 shows the device of the matrix type in which the 64 addresses are possible and which overly contains a detailed location (30). They are 64 designs with an overly simple detailed location device. It fits in with a standard micro electronics chip packaging component. This device is produced on an abbreviation 1.5cmx1.5cm silicon chip substrate in 64 750micrometerx750micrometer central fields which overly contain a detailed location. Each \*\* detailed location (32) is overly 2 a neighboring detailed location and 50 neighboring micrometers of abbreviation from which it is separated 50 micrometers. each lower part of each -- the connection circuit overly for detailed electrodes is running the outside periphery (10mmx10mm) of the metallic contact pad (300micrometer<sup>2</sup>) (34). The inside periphery which rose can be formed between the field which overly has a detailed location, and a contact pad, and forms the mold cavity which can hold the sample solution of about 2-10microl. Being able to mount a "chip" into a standard KUADO package, a chip contact pad (34) wires the pin of this KUADO package. The system containing the chip exceeding 1, the further packaging, and a circumference component can be designed so that it may deal with the problem relevant to addition of a clinical diagnosis, i.e., the sample matter, migration of a fluid, and the containment of the biohazard matter. Subsequently, the chip which carried out packaging is connectable with the microprocessor control DC power supply source and multimeter instrument which can control and operate this device. It is meant by this invention that incorporation of three sorts of basic components which will be pinched substantially

is probably eventually included in device manufacture (before addressing). annealing of; micro electronics detector with which annealing of; sample which the basic chip device with which a cementing material adheres to it has in the mid-position, and which will come out and exist, or the fluid container component is carried out on the top-most vertices of a basic chip device and which will come out and exist, and the external controller component is carried out to the pars basilaris ossis occipitalis of a basic chip device -- I will come out. The problem of a large number relevant to a production technique and matter compatibility is solved by this strategy.

I (b) The micro lithography producing method I (b) and (1) making process A general micro lithography technique or a general photograph plate technique can be used for production of a huge number of small compound "chip" mold devices which overly have a detailed location.

Although a complicated photograph plate technique is not required for production of a device, special consideration is just required for the requirements of operating an electronic device effectively in selection of \*\*, and a water solution.

64 pieces shown in drawing 3 -- a detailed location device (30) is overly producible relatively using a simple mask design and a standard micro lithography technique. Generally, substrate material is a with a 1-2cm thickness [ 0.5 micrometers in the silicon wafer of 2, or thickness ] chip. A silicon chip carries out protective coat formation first on the silicon-dioxide (SiO<sub>2</sub>) insulation coat with a thickness of 2 micrometers applied by plasma heating chemistry steamy deposition (PECVD).

In degree process, the deposition of the 0.2-0.5-micrometer metal layer (for example, aluminum) is carried out by vacuum evaporation. Moreover, the deposition of the metal can be carried out with a sputtering technique. In addition to aluminum, the combination of gold, silver, tin, titanium, copper, platinum, palladium, the Pori silicon, carbon, and various metals is included in the suitable metal and suitable ingredient for a circuit. The special technique made to stick suitably for insulating-substrate material (SiO<sub>2</sub>) is used with a different metal. For example, for circumference contact pads, aluminum and for link circuits, the Pori silicon, a different metal, and other \*\* can be used for the conductive component with which devices differ so that noble metals (gold or platinum) may overly be used for detailed electrodes.

Subsequently, protective coat formation of the chip is carried out by the photoresist (SHIPURE (Shipley), micro POJITTO AZ1350J) of forward electrification, and by the circuit pattern, a mask (\*\* place (light field)) is carried out, it exposes, and negatives are developed. This resist that carried out the photograph dissolution is removed, and exposure aluminum is etched. The island of a resist is removed leaving an aluminum circuit pattern on a chip shortly. to this, the outside periphery of the metallic contact pad, a connection circuit (wiring), and the address are possible -- it is overly offered as a lower substrate of a detailed location -- the central array of a detailed electrode is overly contained.

If PECVD is used, subsequently protective coat formation of this chip will be first carried out by 0.2-0.4-micrometer SiO two-layer in a 0.1-0.2-micrometer silicon nitride (Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) layer. subsequently, a chip -- a forward photoresist -- covering -- a contact pad -- and a mask is overly carried out to detailed electrode locations, it exposes, and negatives are developed. the resist which carried out the photograph dissolution -- removing -- SiO<sub>2</sub> and four layers of Si<sub>3</sub>Ns -- etching -- an aluminum contact pad -- and a detailed electrode is overly exposed. Subsequently, if a surrounding island resist is removed, a contact pad and while connection wiring between detailed electrodes had overly been insulated by SiO<sub>2</sub> and four layers of Si<sub>3</sub>Ns, it will remain.

SiO<sub>2</sub> and four layers of Si<sub>3</sub>Ns offer a property important for the functionality of this device. The second SiO two-layer offers the better sealing nature with an aluminum circuit contacted and improved.

Moreover, it can also insulate and seal using resist material. Drilling of the circuit by the electrolysis effect operation at the time overly of the detailed electrode carrying out actuation open is prevented by this. It uses as the last surface which covers Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Because, the reagent and it which are used overly for embellishing a detailed electrode surface adhering to the specific binding matter and continuing are because reactivity is notably low.

I ((b) 2) An osmosis layer and adhesion layer formation process At this event, the detailed electrode location is overly ready for embellishing with the osmosis layer and adhesion layer on a device which were specialized. This is the important mode of this invention. The object is overly producing the adhesion surface layer which has the medium osmosis layer and the optimal joint property of having an alternative diffusion property on a detailed electrode.

The optimal, since the specific binding matter adheres, this adhesion layer has the functionalization location of 105-107 per mum<sup>2</sup>. adhesion of the specific binding matter -- the lower part from organic-

functions-izing -- do not protective-coat-form or a front face must not be insulated so that a detailed electrode may overly be protected. an organic-functions-ized device -- the active metal of a certain fraction (- 5% thru/or 25%) -- it is required for a detailed electrode surface overly to be still able to approach a solvent (H<sub>2</sub>O) molecule, and for diffusion of a counter ion (for example, Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>) and electrolysis gas (for example, O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>) to arise.

Moreover, it is designed so that diffusion may also produce a medium osmosis layer. In addition, this osmosis layer must overly have the pore marginal property of checking or blocking a big cementing material, a reactant, and the analyte, from the physical contact to a detailed electrode surface. an osmosis layer overly differs from the cementing material of a detailed location physically -- active -- the detailed electrode surface is overly maintained.

Although the electrolysis reaction which electrophoresis transport takes can overly be produced on a detailed electrode surface by this design, the disadvantageous electrochemistry effectiveness over a cementing material, a reactant, and the analyte is avoided.

Moreover, an osmosis layer can also design the harmful matter (H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, free radical, etc.) generated at an electrolysis reaction so that the SUKYA benzo\*\*\*\* matter may be included. The sub-layer of an osmosis layer can be designed for this object.

An osmosis layer is producible using various designs and a technique. (1 "a loan (Lawn)"), (2) "a mesh (Mesh)", and (3) "porous (Porous) ones" structure are included by general design.

Making a linear molecule or a polymer arrange perpendicularly from a surface of metal is included in a loan mold osmosis layer by the approach similar to the grass which grew thick. Such structures can be formed by making the hydrophobic molecule of a line or polymer nature adhere to a surface of metal directly, having the minimum bridge formation between vertical structures. Ideally, these hydrophobic linear molecules are 2 functional-group molecules which have one end suitable for carrying out covalent bond to a metal pad, and one more end suitable for the covalent bond of a cementing material.

The irregular array of the polymer nature child who forms the mesh Mr. structure of having the average pore size determined with extent of bridge formation is included in a mesh mold osmosis layer.

Although such structures are not limited, a polymerization is carried out and they can be formed by the hydro gel mold material like polyacrylamide, agarose, other biological material that can construct a bridge, and abiosis study-material.

Although it does not limit to a pore mold osmosis layer, the activity containing a polycarbonate, polysulfone, or glass material of \*\* in which the top-most vertices on the front face of a layer to a metal pad can form a channel or a hole directly is included. In all cases, the surface of metal must be fixed physically [ this osmosis layer ] or chemically, and-izing must be able to be carried out [ organic functions ] so that the functional group may be included or a cementing material can adhere to the front face.

the metal which uses aminopropyl triethoxysilane (APS) for the one desirable approach of producing loan mold structure -- induction-ization of a detailed electrode surface is overly included. APS reacts easily with an oxide and/or hydroxyl on a metal and a silicon front face. APS is a primary-amine radical for share coupling which a cementing material follows, and combines an osmosis layer and an adhesion layer. By the surface binding site, APS produces high organic-functions-izing (namely, many primary amines) of level, and organic-functions-ization to which organic-functions-izing of medium level and Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> front face were dramatically restricted on the SiO<sub>2</sub> front face relatively on the aluminum front face which oxidized slightly.

An APS reaction is performed by processing all device (for example, chip) front faces for 30 minutes at 50 degrees C with 10%APS solution in toluene. Subsequently, this chip is washed in toluene and ethanol and, subsequently it dries at 50 degrees C for 1 hour. this -- a detailed electrode surface of metal is overly organic-functions-ized by many primary-amine radicals (105-106/micrometer<sup>2</sup>). this time, the cementing material was induction-ized -- covalent bond can overly be carried out to a detailed electrode surface. It can be increased by the depth of this "loan mold" osmosis layer by using a polyoxyethylene = screw (amine), a screw (polyoxyethylene = screw (amine)) and other polyethylene glycols, or the same compound.

The APS method often acts on adhesion of an oligonucleotide cementing material. Drawing 4 shows the device in which a 3'-end aldehyde induction-ized oligonucleotide (40) is made to adhere to an APS organic-functions-ized front face (42). Although this expresses one approach, other various approaches which form an osmosis layer and an adhesion layer are possible. these -- the base electrode itself -- (1) base --; (2) which forms a secondary metal layer by overly carrying out electroplating to a detailed



electrode -- the activity of self--assignment addressing by overly forming an osmosis layer by the electric polymerization to a detailed electrode location, or forming the osmosis layer and the adhesion layer which overly convey an activation polymer and a reagent to a detailed electrode surface according to (3) free-field electrophoretic process, and continue is included.

A design and production of an I(c). micro machine processing device This section indicates how a device is produced using micro machine processing techniques (for example, punching, grinding, etc.) or a non-lithography technique. generally, these devices are relatively bigger than what is produced by micro lithography -- it overly has a detailed location (> 100 micrometers). These devices can be used for application of the preparative isolation mold like analysis application and biopolymer composition, sample preparation, a reagent dispensing machine, a preservation container, and disposal. The location in which big ADORUSU is possible is producible in a three-dimensions format (for example, tubing or a cylinder) in order to carry a lot of cementing materials. This device is producible using various \*\* which include plastics, rubber, silicon, glass (overly [ For example, ] detailed channel and micro capillary tube etc.), or the ceramics, although it does not limit. Low fluorescence material is ideal by analysis application. In the case of a micro machine processing device, a connection circuit and big electrode structure can be printed on \*\* using the standard circuit board printing technique known by this contractor.

the address is possible -- a detailed location device can overly be produced comparatively easily using a micro machine processing technique. drawing 5 -- 96 pieces -- it is overly the mimetic diagram of a detailed location device. It produces from suitable ingredient base material (2cmx4cmx1cm) by punching these 96 holes (diameter of 1mm) that the detailed location device overly took the balance through \*\*, and vacated spacing. An electrode circuit board (52) is formed on the plastics material base material of the thin sheet which overly fits into the top face of a detailed location component (54) at accuracy. Each wiring (printed circuit) in each \*\* detailed location (55) is included on the underside of a circuit board. short platinum-electrode structure (- 3 -4 mm) (62) -- each -- it is designed so that it may overly extend to a detailed location chamber (57). This printed circuit wiring is covered with the suitable waterproof insulating material. It converges on a socket and, thereby, printed circuit wiring is connected to a compound switch controller (56) and DC power supply source (58). The device is selectively immersed into a common buffer-solution reservoir (59), and operates in it.

the inside of the device produced with the microphone IROMA scene processing technique and the micro lithography technique -- although the main function of a detailed location is overly the same, those designs differ. the device produced with micro lithography -- setting -- an osmosis layer and an adhesion layer -- a lower metal -- it overly forms directly on a detailed electrode. In the device produced with the micro machine processing technique, the osmosis layer and the adhesion layer are physically separated from each metal-electrode structures (62) of those with each chamber or the buffer solution in a container (57) (refer to drawing 6 ). In a micro machine processing device, this osmosis layer and an adhesion layer can be formed using the gel of an organic-functions-ized hydrophilic property, the film, or other suitable porous material.

Generally, the range of the thickness of the united osmosis layer and an adhesion layer is 10 micrometers - 30mm. For example, the thing (- 0.5mm) of each each in a device selectively filled up with a detailed location chamber is overly made using 20% - 35% of polyacrylamide (it has poly lysine 0.1%) qualification hydrophilic-property gel. Such gel concentration forms the ideal osmosis layer which has 2nm - 10nm of pore limitations. The primary-amine functional group for the adhesion which the specific binding matter follows is offered by the poly lysine incorporated in gel. By this type of gel osmosis layer, an electrode can be actively operated in DC format. Although a small counter ion lets a gel osmosis layer pass through it when an electrode is activated, a big specific binding matter molecule is condensed on an outside front face. They carry out covalent bond to the outside layer of a primary amine, and this serves as an adhesion layer efficiently here.

Another technique for formation of an osmosis layer and an adhesion layer is including in the base of each \*\* detailed location chamber at a porous film ingredient. Subsequently, a membranous outside front face is induction-ized by the chemistry functional group, and an adhesion layer is made to form. A suitable technique and suitable \*\* to perform this approach are known by this contractor.

There never are not a design of both micro lithography and a micro machine processing device and the above-mentioned publication about production what means limiting other deformation of a basic device or a gestalt. It can consider as many deformation of the device which overly has a detailed location in which the address of a large number or a fraction is more possible or the combination of a device,

different analysis, and application of an aliquot. Deformation of the device which has the location in which the bigger address is possible can be designed to application to the biopolymer composition for preparative isolation, sample preparative isolation, a cell sorting system, the Inn SAICHU hybridization, reagent dispensing, a conservative system, and abolition processors.

II. Self-assignment addressing of a device The device of this invention can carry out the self-address of each \*\* detailed location electronically by the specific binding matter. the device of the electrification specific binding matter itself is specific -- the haulage to a detailed location is overly influenced directly, or it is caused. Generally the cementing material is organic-functions-ized so that it may react to an adhesion layer easily and may carry out covalent bond to it. a device is specific without needing a until external process, a device, or an instrument to some extent -- the specific binding matter is oriented and spotted physically, or is overly installed in a detailed location. This self-addressing process is quick and specific, and can be performed in a continuation format or a parallel format.

The address of the device can be continuously carried out by the specific binding matter by [ which chose it as the charge (potential) of objection of the thing of DC mode and the specific binding matter ] overly maintaining a detailed location. a cementing material should be carried when a cementing material has net negative charge -- a detailed location will overly just be deflected. Reversely, the cementing material of a negative charge which overly just carried out electrification using the detailed location will be carried. continuation addressing -- the charge (objection [ as opposed to / overly / The address is carried out. / a detailed location ]) of the :objection to the remaining selection in process which overly deflects a detailed location -- all -- others -- overly deflecting one detailed location (or other electrodes) with thing [ of the group restricted to the charge of the thing; objection which overly deflects a detailed location / for which a detailed location is overly deflected ];, or a reverse charge is included. Although the thing which exceed 1 or it with a reverse charge in a certain case and for which a detailed location is overly deflected strongly is desirable, probably, a detailed location has the overly desirable thing of other groups made to deflect weakly. according to this process, while [ remainder ] overly carrying out the address of the detailed location, it should protect -- the address of the detailed location can overly be carried out beforehand. the case where there is no cementing material in the attachment site on a joint location superfluously -- everything but one piece -- specific [ influence / overly / only a detailed location and ] -- free field electrophoresis haulage can overly be carried out to a detailed location. the specific binding matter can be promptly carried through a bulk solution, and it carries out covalent bond to the special front face of an adhesion layer promptly -- specific -- it can overly condense directly in a detailed location (group). It depends for a haulage rate on the size of a cementing material, a charge, the electrical potential difference used [ overly ] between detailed locations, and the level of a current. Generally, a haulage rate can be made into the range for several minutes from several seconds. specific -- the capacity which overly condenses a cementing material, a reactant, or the analyte (72) electronically on a detailed location (72) is shown in drawing 7 . all -- others -- between specific binding matter addressing processes, a detailed location can be protected and it can overly leave it with un-acting. any unreacted matter is specific -- it is removed by overly carrying out the polarity of a detailed location reversely, and carrying out electrophoresis of it to an abolition location. all requests -- this cycle is repeated until the address of the detailed location is overly carried out by those specific binding matter. drawing 8 is specific at a specific oligonucleotide cementing material (82, 84, 86) -- the continuous process for overly carrying out the address of the detailed location (81, 83, 85) is shown.

the same specific binding matter is conveyed and condensed at the parallel process which overly carries out the address of the detailed location, and 1 is exceeded at it -- specific -- one thing for which a detailed location (specific radical) is overly activated simultaneously is included so that it may overly react with a detailed location. Continuing parallel processing is the same as that of a continuous process.

III. Application of a device If self-ADORUSU of the device is carried out by the specific binding matter, a reaction and analysis two or more processes of various molecular biology molds and compound can be performed on a device. The device of this invention offers electronically the active and dynamic control on many important reaction indexes. By this electronic control, a new physical device is guided to the reaction currently controlled, and a reaction rate, singularity, and sensibility are improved notably. The improving point in these parameters generated from device capacity is based on concentration of the transport; (2) reactant with overly quick reactant to a detailed location or analyte or analyte containing the specific binding matter which carried out : (1) adhesion. specific -- super- -- lifting [ of a reaction rate with the specific binding matter on a detailed location front face ]; (3) -- it is overly electronic control

and a direct operation of the strict nature of unreacted and clearance [ from a detailed location / of a nonspecific joint component / quick and alternative ];, and (4) optimum-coupling conditions. Although the device with which the self-address of this invention was carried out is not a reaction and the thing of which approach; definition is done various two or more processes formed [ overly ] into the detailed format, and/or compound : DNA of the - conventional format, an RNA hybridization process, and analysis;

For example, adhesion target DNA / probe DNA, adhesion probe DNA / target DNA, adhesion prehension DNA / target DNA / probe DNA;

- The plurality or compound hybridization reaction of both formats of continuation and parallel;
- A restriction fragment and general DNA/RNA fragment size analysis;
- A molecule biological reaction, for example, a restriction enzyme reaction, and analysis, a ligase reaction, a kinase reaction, and DNA/RNA magnification;
- The antigen / antibody reaction containing large or a small antigen and hapten;
- Diagnostic assay (the Inn-SAICHU hybridization is included), for example, hybridization analysis, a gene analysis, fingerprint printing, and immunodiagnosis;
- Sample preparation, sorting of a cell, selection, and analysis;
- Living thing molecular binding method (namely, the covalent bond and the noncovalent bond indicator of the nucleic acid in the reporter radical which includes fluorescence, a chemistry luminescent \*\* colorimetry radical (colorimetric), and radioisotope, an enzyme, protein, or an antibody);
- Combination composition of biopolymer composition, for example, an oligonucleotide, or a peptide;
- composition of a water-soluble composition polymer, for example, a hydrocarbon, and a line -- polyacrylic acid;

In a row - macromolecule molecule, nano structure (particle and structure of nano meter size) composition, and production can be performed promptly.

III (a) Nucleic-acid hybridization Nucleic-acid hybridization was used as main examples of this invention. Because, it is because the importance in those diagnoses and the property of the joint (compatibility) reaction of a difficult mold that it exceeds 1 are expressed. This is the right especially when performing it in the compound format which requires the strict conditions from which each hybridization reaction of each differs.

By the device and approach of carrying out an application for patent, nucleic-acid hybridization can be performed in the former and new various formats. the capacity of the device which controls a reaction parameter electronically -- nucleic-acid hybridization analysis and especially electronic strict control (ESC) -- each each on an array -- a detailed location is overly presented.

"Nucleic-acid hybridization" The becoming word means including all the hybridization reactions between the nucleic acid of all the nature that includes a deoxyribonucleic acid (DNA), a ribonucleic acid (RNA), a polynucleotide, and an oligonucleotide, and synthetic gestalten, and a nucleic-acid derivative.

The conventional high BURIZESHON format like "dot blot" hybridization and "sandwiches" hybridization can be held by the array or matrix type of the device which carries out an application for patent, and a large scale.

As an example, the APEX device for DNA-hybridization analysis is designed and produced, and it uses by the formula as follows. The array of a detailed location is overly first manufactured using a micro lithography (or micro machine processing) technique. It overly depends for the number of detailed locations on the final application in which the address on an array is possible. The self-address of this device is promptly carried out to a specific oligonucleotide group in a continuation format. In this case, although a specific oligonucleotide is a 3'-end aldehyde organic-functions-sized oligonucleotide of the range of 6 serious-condition - 100 serious condition, it can adhere a still longer polynucleotide by request. an aldehyde functional group is specific -- a detailed location adhesion front face can be made overly to carry out covalent bond (refer to drawing 4 ) The specific oligonucleotide of this group is easily compoundable on the DNA synthesizer of the former which used the conventional technique. the hole with which ribonucleotide control of the composition of each specific oligonucleotide was carried out -- it starts from a glass (CPG) base material. In this way, ribonucleotide contains in a 3'-end location, and subsequently, after this is compounded and refined to an end dialdehyde derivative, it is easily converted by periodate oxidation. The aldehyde containing an oligonucleotide (40) will overly react easily with the primary-amine functional group on a detailed location front face according to the CIF (Schiff) base reaction process.



Electronic addressing of a specific oligonucleotide and a device is shown in drawing 8. the 1st is specific -- while addressing of a detailed location (ML-1) (81) and its specific array oligonucleotide (SSO-1) (82) overly maintains specific microelectrode (ML-1) to forward DC potential -- all -- others -- it attains by maintaining microelectrode to electronegative potential ( drawing 8 (A)). Free field electrophoresis of the aldehyde functionalization specific array in the aqueous buffer solution (SSO-1) is carried out to ML-single address, and shortly after it condenses it there (> 10<sup>6</sup> times), covalent bond of it is carried out to the front face of ML-1(81). all -- others -- the detailed electrode is maintained by negative, and is overly still protected or intercepted from the reaction with SSO-1 array (82). subsequently, ML-1 potential -- negative -- it reverses to (-) -- making -- \*\*\*\* -- a gap -- un--- electrophoresis also of processing SSO-1 is carried out to an abolition system. a cycle -- all requests -- until the address of the detailed location is overly carried out in those specific DNA arrays -- SSO- 2 (84) -- ->ML- 2 (83) and SSO- 3 (86) -- ->ML- 3 (85) and SSO-n -- ->ML-n is repeated ( drawing 8 (D)).

Another approach of carrying out the address of the device is conveying the specific binding matter like a specific oligonucleotide from an electronic reagent supply device. This supply device holds the cementing material or reagent of a large quantity, and will be used for carrying out the load of the analytic device. The cementing material will be electronically conveyed between two devices. By this system, the complicated fluid delivery system between the devices in my KUROBI pet addition and a device solved, and the need for physical actuation was lost.

another approach is specific to the pan which carries out the address of the device -- it is overly performing combination composition of a specific oligonucleotide in a detailed location. A next section indicates combination composition.

Even after carrying out the address of the device in a specific DNA array, it is important that a detailed electrode overly continues [ the detailed location bottom ] being [ overly ] an independent actuation nature direct-current (DC) electrode on an array device. the lower part -- since it is made to adhere to an electrode surface so that it may not insulate overly chemically [ a detailed electrode ] or physically, this is possible. Each \*\* detailed electrode is overly in a detailed location front face, and each \*\* detailed electrode can still make a strong direct current required for free field electrophoresis transport of other electrification DNA molecules from there. In this way, electronics control of the DNA array device is thoroughly carried out over the reaction which all the modes of DNA hybridization and which others follow.

An example of the hybridization process controlled electronically is shown in drawing 9. in this case, each address is possible -- a detailed location overly has a specific prehension array (90). \*\* which gives the sample solution containing Target DNA (92) to this device. all -- a detailed location is overly activated -- having -- this -- Sample DNA is overly condensed in a detailed location ( drawing 9 (B)). When the target DNA molecule from diluted solution overly came to be condensed by the detailed location at high concentration, hybridization can be carried out to the specific complementary DNA array on a front face very promptly. Although all the \*\*-hybridization DNA was overly repelled from the detailed location when detailed electrode potential was made overly to \*\*\*\*\*, Target DNA has hybridized ( drawing 9 (C)). In the same format, the complex which was made to hybridize a reporter probe and was hybridized at the continuing process is detected.

The detection which a target DNA molecule follows is improved by electronic control of a hybridization process improving the whole hybridization effectiveness, and removing \*\*-specific DNA from a detailed location field. It is expected that the target sequence of 10,000 to 100,000 copy is detectable in \*\*-magnification genomic DNA. Under an isothermal condition with this type of hybridization reaction quite lower than Probe T<sub>m</sub>; it can carry out less than [ several minutes or it ] by the minimum external actuation (that is, the conventional washing process is removed thoroughly).

Having the target DNA fixed on the front face and making a specific probe hybridize subsequently to these targets DNA are included in the usual format of another DNA-hybridization assay. Either of the targets DNA from whom the same target DNA of two or more locations or a specific location differs can be included in this format. Drawing 10 shows the improvement version of this continuation hybridization format. In this case, the address of the detailed location (101-107) is overly carried out by different prehension DNA. HAIZURIDAIZU [ these / an oligonucleotide / a specific different array and a specific different continuation format ] (108 109). one by one, a detailed location is just deflected, and a molecule is conveyed to itself and, subsequently to negative, it overly deflects it -- making -- this molecule -- the following -- it overly conveys to a detailed location. although the DNA probe hybridized

specifically overly remains in a detailed location in suitable electrode potential -- a \*-hybridization probe -- a degree -- it is overly conveyed to a detailed location. The indicator of the array specific oligonucleotide probe can be carried out by the suitable reporter radical like a fluorescence chromophore.

The device which carries out an application for patent can offer electronic strict conditions. Strict control is required for hybridization singularity, and important for especially decode of a little salt radical mispairing in point mutation. Drawing 11 shows how electronic strict control can be used for a little salt radical mispairing analysis. Electronic strict control is applicable also to analysis of two or more-base-mispairing. In drawing 11 (A), the perfect involution DNA hybrid (110) is slightly more stable than a mispairing DNA hybrid (112). It is possible to hold a perfect involution DNA hybrid, denaturalizing or removing this mispairing DNA hybrid by making negative overly deflect a detailed location ( drawing 11 (B)), and passing to the time amount which had the electrophoresis power of the specified quantity indicated ( drawing 11 (C)). Drawing 15 is comparing the result of the electronic hybridization process using electronic strict control, and the conventional hybridization process. G of 15 serious condition and A point mutation probe about Ras12 oncogene mutation are contained in hybridization. The result of electronic hybridization shows the hybridization effectiveness improved notably and the very big discernment ratio about a little salt radical mispairing exceeding a conventional method.

In the further improvement, the device which carries out an application for patent presents with the strict control according to individual each specific hybridization reaction produced on this device. In effectiveness, each hybridization is an independent reaction. It is impossible to attain the strict nature optimal about all the hybridization events produced in the same hybridization solution in a former or passivity array format. However, the active array device of this invention can offer electronic strict nature which is overly different in different hybridization in a detailed location, even when they arise in the same bulk hybridization solution. This is contributing to conquering sequencing (SBH) by the conventional matrix or the array hybridization format, and the hybridization format, and the limitation of other compound analysis by birth.

improving the singularity (namely, discernment ratio) and (detection of single point mutation -- like) sensibility of hybridization -- in addition, the usual oligonucleotide out of range can be used for these application by electronic strict control. It is thought by the conventional hybridization method that the oligonucleotide of the range of 8 serious-condition - 21 serious condition has possible point mutation detection. In the latest practice using the conventional hybridization method, the ORIKO nucleotide of 10 serious-condition - 19 serious condition is most frequently used with these conventional methods using the temperature and salt concentration of strict control. Since an oligonucleotide shorter than 10 serious condition was not able to be permitted in compound hybridization and the array shorter than;8 serious condition ran short of hybridization effectiveness, it became clear that even an activity was not considered. The long array exceeding 21 serious condition does not have \*\*\*\*\*, either. Because, it is because they have dramatically the discernment ratio between the probes of involution and mispairing only in a few. The capacity to identify the difference of the hybridization signal between involution and a mispairing probe declines notably as array length becomes long exceeding 21 serious condition.

this invention persons discovered that the hybridization on the APEX device which has electronic strict control could be used also for the short (7 serious condition and thing below it) oligonucleotide of long (thing exceeding 22 serious condition and it) both by the very high discernment ratio. The short oligonucleotide array (7 serious condition or thing below it) has the advantage in sequencing (SHB) by hybridization. The array of short die length can be aligned with a small number of oligonucleotide (8 serious-condition = 65,536, 7 serious-condition = 16,384, 6 serious condition = 4,096) which should be used about this SBH. If a long array (thing exceeding 22 serious condition and it) is used with electronic strict mutation analysis, sensibility is more high and alternative mutation analysis can be performed. By using a longer probe, high sensitivity can be offered in a very complicated DNA sample, and high whole hybridization effectiveness can also be offered.

The Inn-SAICHU hybridization can be performed using an electric hybridization technique. Inn-SAICHU expresses a fundamentally different hybridization format of carrying out direct detection of the inside, although Target DNA (or RNA) is removed from a cell. Generally the Inn-SAICHU hybridization method is complicated and it is almost impossible to take time amount and to detect a short target sequence (namely, single point mutation). The Inn-SAICHU hybridization controlled electronically adheres to a direct cell on the activity front face of the device concerned, and can be performed on the APEX device to process (about a sample preparation technique, it is example 14

reference). However, this APEX device makes intracellular DNA hybridize a reporter probe electronically directly rather than it extracts DNA from a cell. If electronic strict control is used, the both sides of selectivity and sensibility will improve by removing most \*\* -specific bindings and improving the whole hybridization effectiveness. Moreover, the capacity with which electronic strict control presents hybridization also offers the new device in which DNA hybridization is detected, without using a reporter radical indicator DNA probe. It offers an approach to detect the hybridization process itself still more directly. A fluorochrome detection process is shown in drawing 12 , and it indicates in the examples 4 and 6. The direct detection of a DNA hybrid can be attained by using the DNA binding coloring matter like an ethidium bromide. Although this coloring matter is combined with the both sides of a double strand and a single stranded DNA, it has big compatibility by the former. in drawing 12 (B), the coloring matter (122) which just carried out the charge was deflected to negative -- it is overly conveyed to a detailed location. This coloring matter is hybridized and (120) combined with the both sides of the DNA array of \*\* -hybridization (121) ( drawing 12 (C)).

overly just deflecting a detailed location and passing the power of the specified quantity predetermined time -- this coloring matter molecule -- \*\* -hybridization -- it overly combines with a detailed location and is removed selectively. The suitable amount of currents which does not act to a DNA hybrid detrimentally can be offered. Subsequently, fluorescence detection of the hybridization DNA combined with the coloring matter molecule is carried out using association or an integrated optics system.

by the device of this invention, a nucleic-acid hybridization reaction and a reaction are presented with the important advantage which the following repeats : the hybridization of Target DNA and/or the probe DNA array by which (1) dilution was carried out happens -- specific -- super- -- quick transport in a detailed location (group). This process can be caused in the range for 5 - 120 seconds.

(2) the hybridization of Target DNA and/or the probe DNA array which were diluted happens -- specific -- super- -- concentration in a detailed location (group). Probably the concentration effectiveness exceeds far 1 million times ( $> 10^6$ ) as many \*\* as this.

(3) the hybridization of a \*\* -specific binding target DNA array happens -- specific -- clearance overly quick from a detailed location (group). This process can be caused in the range for 5 - 120 seconds.

(4) the hybridization of the complementary target DNA array which competes happens -- specific -- clearance overly quick from a detailed location (group). This process can be caused in the range for 5 - 120 seconds.

(6) Capacity that the hybridization reaction which a large number became independent of can be performed in several minutes.

(7) Capacity that a hybridization process can be performed at an isothermal condition far lower than  $T_m$  of a probe and the minimum external actuation, or a washing process.

(8) The activity of the electronic strict control (ESC) for removing a partial hybridization DNA array.

(9) Capacity that hybridization analysis of the non-amplifying genome target DNA array of the 1,000 - 100,000 copy range can be performed.

(10) The activity of ESC for improving the discernment ratio (namely, resolution) and sensibility of single base mispairing hybridization (point mutation).

(11) Capacity which can use one shorter (7 serious condition and thing below it) than what was used by the conventional hybridization method or of those long (thing exceeding 22 serious condition or it) single point mutation probes.

(12) The activity of ESC for presenting matrix hybridization with each strict control.

(13) Improve detection of the hybridization event by removing a \*\* -specific background component.

(14) Capacity that electronic Inn-SAICHU hybridization can be performed by the immobilized cell.

(15) Development of the detection approach without the need of using the reporter probe or Target DNA which did the indicator in [ in order to detect hybridization ] share.

III (b) Repeatability of a device carrying out addressing of the device of each [ the specific binding matter ] independently -- in addition, it is also possible to produce the master device which can copy the specific binding matter to other devices. This expresses another approach of production of a device, or manufacture. The process of a device duplicate is shown in drawing 13 . The mass TATE vice by which the address was carried out in the specific binding array and which overly includes a detailed location is made to hybridize with each complementary DNA array (130). It activates and, so, these complementary sequences can overly carry out covalent bond to a detailed location adhesion layer.

The non-address sister device (132) containing an adhesion layer was compared with the hybridized master device ( drawing 13 (B)). a master device -- super- -- a detailed location -- negative -- deflecting -

- \*\*\*\* -- a sister device -- the detailed location is overly just deflected. It denaturalizes electronically and even the sister device in which an activation DNA array overly carries out covalent bond to a detailed location conveys a DNA hybrid ( drawing 13 (C)). Depending on the device structure where the cross talk between detailed locations is overly minimum-ized, this process can be performed by parallel or continuation. A hybrid can denaturalize applying sufficient negative potential or by using the chaotropic agent or modifier which just carried out the charge.

III (c) A component device and accumulation APEX system An accumulation APEX system can be built combining many separate APEX devices or chips. Since the device of an APEX mold can perform the function in which many differ and can move a reactant by free field electrophoresis, it can develop integrated system. : (1) Sample preparation and a hybridization analysis system can be built combining the separate APEX device or the separate chip which joins together selectively, dissolves a cell, prepares (2) reagents electronically, performs (3) pre-hybridization, is made to act as a (4) abolition processing unit, and saves (5) DNA fragments, and performs (5) hybridization analysis (refer to an example 14 and drawing 19). These accumulation APEX microelectronics systems are equivalent to a perfect clinical analysis machine or a programmable molecular biology laboratory (namely, laboratory on a chip). However, in the point that it requires only the minimum fluid engineering of a sample, a reagent, and a reactant, or physical actuation, it is over automatic control (robotics) or other detailed analysis devices. Although it does not limit to the further mold of an accumulation APEX system, what can perform the Inn-SAICHU hybridization, a cel selector, a processor system, and an immunodiagnosis analyzer will be included.

III (d) A detection system and reporter radical In the case of the ligation reaction containing a fluorescent-labeling reporter radical, in order to analyze a ligation reaction, the microscope detection system of an EPI fluorescence mold can be used on an APEX device. It depends for the overall sensibility of this system on the combined detection component (photon counting cooling charge coupled devices (CCD), enhancement charge coupled devices (ICCD), a microchannel plate detector, or photograph multiplication machine (PMT) system). As an exception method, a high sensitivity CCD chip detector or an avalanche photo-diode (APD) detector can also be combined with an APEX device still more directly. These systems will reduce the need for compound light study a little. Probably, opto-electronics incorporating an electronic sensing element is included in the system which furthermore progressed to the APEX chip. The both sides of optical and direct electronic detection of DNA are possible in these systems. Sandwiching an onboard controller component in a basic APEX chip component with a micro electronic detector ultimately will be included in the version which progressed most. The electronic and optical (waveguide) circuit will be directly produced through the pars basilaris ossis occipitalis of an APEX component. The problem of a large number relevant to the production technique for considering an APEX component as throwing away, ingredient compatibility, and cost efficiency is solved by this strategy.

In addition to various fluorochromes and reporter radicals which can use a DNA probe, Target DNA, or an antibody for carrying out an indicator, the indicator or reporter radical of a mold besides; can also be used. A chemistry luminescence indicator, a \*\*-linearity optical (frequency doubler) ingredient, a biotin / avidin complex, and various enzymes are included by these.

III (e) Combination biopolymer composition The device of this invention can also perform combination composition of the biopolymer like an oligonucleotide and a peptide. According to this process, self-assignment can be compounded without completely needing external detection, effect, or machine motion. In order to perform actual composition in a microscope location, the physical motion with complicated micro robot pipetting system for physical protection and the compound photolithography method, and a reagent delivery or component is required for other processes of combination composition. Much arrays are dramatically compoundable on a device with the combination composition indicated to this invention. Using the free field electrophoresis for conveying and carrying out a delivery, condensing, making a monomer react, and carrying out coupling of the reagent in the detailed-detailed location in which the specific address on a device is possible, or deblocking a reagent is included in the fundamental concept of combination composition. the capacity of original [ concept / this ] of a device -- using -- an operation of a neighboring reagent and a reactant to others -- a detailed location is overly protected electronically.

Identification of the selection process in these chemosynthesis processes that are whether the reactant exceeding 1 or it carries out electrification to the net forward or negative or to make this reagent suitable for these processes is also important for this concept.

The one approach of combination oligonucleotide composition is shown in drawing 14. this approach -- one set -- the address is selectively possible -- super- -- a detailed location (140) -- starting -- this -- the front face of a detailed location is overly induction-ized by the blocked primary-amine (X-NH-) radical (142).

the charge deblocking reagent (144) was used for the first process in this process -- alternative deblocking of a detailed location is overly included. In this case, probably, this reagent is charged in the forward (+) charge. This process is performed by [ that \*(ed) - blocked / these ] overly applying negative potential to a detailed location, and overly applying forward potential to a detailed location, protect [ as ] ( drawing 14 (B)). applying forward and negative potential to a selection electrode -- other requests which should be moved from a reagent delivery part, and should \*\* an electrification reagent, - should block it, overly eliminating the reagent from a detailed location -- it overly condenses in a detailed location.

only exposing a system to a phospho RUAMIDAITO reagent (x-C) (146) in the second process -- the first base -- in this case -- the deblock of a cytosine -- chemistry coupling to a detailed location is overly performed. (C) Although coupling is overly carried out to a detailed location front face, don't carry out coupling of the nucleotide to the blocked electrode surface which was \*(ed) - blocked at all ( drawing 14 (C) and (D)). The phospho RUAMIDO chemistry usual in this event is performed to the following \*\*-blocking process.

the -- a 2 deblocking process -- (-- a location [ making negative the electrode location which should be carried out coupling, and having protected it by drawing 14 (D)) and the following base, ] is made forward. this time, this system was exposed to the following base which should be carried out coupling, and it \*(ed) - blocked in this case (x-A) (148) -- alternative coupling to a detailed location is overly attained ( drawing 14 (E) and (F)). each address of coupling and the \*\*-blocking method is possible for all of different DNA arrays -- it is repeated until it is overly compounded on a detailed location front face.

The aforementioned example expresses one possible approach of nucleic acid biosynthesis. Perfect water solubility DNA synthesis is included in another approach. In this case, oligonucleotide composition is performed with a water-soluble nucleic-acid derivative using the water-soluble coupling agent like a 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDCA) which carried out electrification. Probably, this approach has the important advantage exceeding the technique based on the current organic solvent which requires extensive blocking of a base. The activity of many harmful matter more cheaply used at the process based on a current organic solvent of water-soluble composition will be lost. The activity of an electrification monomer and an enzyme is included in the third approach and re-water solubility composition.

III ((e) 1) Oligonucleotide composition using terminal transferase Using nucleic-acid polymerase is included in this approach about combination composition of an oligonucleotide. This approach uses terminal transferase, 5'3of - deoxyribonucleotide triphosphoric acid'-mono-phosphoric ester, and phosphatase. Coupling of the nucleotide is carried out using terminal transferase. This 3'-phosphoric ester acts as a blocking radical which prevents two or more nucleotides adding in each coupling process. For the following coupling process, 3'-phosphatase is used and 3'-phosphoric ester is removed. All reagents are water solubility, and since electrification is carried out, they can use an APEX technique general to all the processes of this combination synthesis method. In this approach, the APEX matrix which has A, T, G, and C nucleotide to which at least those 5'-hydroxyl was minded and the address of the suitable number on a device was carried out, and which have overly been connected with the detailed location is used. The first nucleotide is connected with a standard APEX address technique.

The 1st round of a coupling reaction is started by making negative deflect all the electronic two reagent dispensing [ which is made overly to just deflect a detailed location and subsequently contain the 3'-phosphoric ester of terminal transferase and deoxyadenosine triphosphoric acid ] machine by which coupling should be carried out to A nucleotide by the second place of the. this reagent is suitable -- free field electrophoresis is overly carried out to a detailed location, and coupling of the A nucleotide is carried out to the first nucleotide by terminal transferase on a matrix. Since nucleotide triphosphoric acid is esterified by the phosphoric-acid radical at least by the 3', terminal transferase adds one nucleotide simultaneously.

after nucleotide coupling is completed -- this -- if a detailed location is overly deflected to negative and an abolition processor is just deflected, an enzyme and the consumed reagent will be removed. this process -- all -- it repeats between the 1st round coupling of G, C, and T nucleotide until coupling of the



detailed location is overly carried out.

When the 1st completeness round (A, T, G, and C) of coupling is completed, it makes negative deflect all the reagent dispensing machine that overly just deflects a detailed location and has a 3'-phosphatase enzyme. Free field electrophoresis of the 3'-phosphatase enzyme is overly carried out to a detailed location, and it hydrolyzes 3'-phosphoric ester there. If phosphoric ester is removed, 3'-phosphoric ester will remain and the coupling reaction of the next round will be ready. This coupling reaction is performed until a desired oligonucleotide array is completed on an APEX device.

In addition to DNA synthesis, the same process can be developed into RNA biosynthesis, peptide synthesis, and other compound polymers.

III (f) The molecular biology reaction and magnification reaction which were controlled electronically An APEX micro electron device and a chip can perform the various molecule biological reactions which include the linearity, an exponential increment, and magnification of Target DNA and an RNA molecule.

Restriction enzyme cutting reaction and DNA fragment analysis can be performed under perfect electronic control. An increment and magnification reaction of the nucleic acid using an APEX device differ from other "DNA chip" devices for [ conventional ] the magnification approaches (PCR, LCR, etc.) which are passive detailed-matrix base materials fundamentally. The new device of magnification is directly produced from the active property of an APEX device. With an active device : Although denature a DNA hybrid selectively under temperature (heat melting temperature) far lower than (1) isothermal-reaction \*\*\*\*\* and its Tm point, and;(2) 2 or it is exceeded, it is made to convey or move promptly forward and backward and; and (3) definition of the DNA are not overly carried out between detailed locations The unique electronic device in which one on a device of requests condenses overly selectively the DNA modification enzyme like restriction endonuclease, DNA or RNA polymerase, and a ligase in a detailed location is offered. The electronic increment in the target DNA by electronic connection and magnification; of the target DNA array by electronic magnification;(3) DNA and RNA ligase of the target DNA by the restriction enzyme cutting; (2) DNA polymerase to which the electronics target of a : (1) ds-DNA array pointed, and (4) RNA polymerase is included by the example of the molecule biological reaction which can be performed on an APEX device and which was controlled electronically, and magnification \*\*\*\*\*.

III (g) Electronic restriction fragment analysis In addition to performing restriction enzyme cutting of ds-DNA, an APEX device and electronic techniques can be used for analyzing and measuring the relative size of a DNA fragment. This is possible when [ of each / DNA fragment / of different die length ] it can overly hybridize in the common prehension array on a detailed location. Or when it can hybridize in the prehension array from which the DNA fragment of different die length differs, the all have the same hybridization or binding energy. A different DNA fragment can be made to \*\* - hybridize selectively with the die length of those \*\*-hybridization arrays or a direct repeat in these cases using electronic strict conditions. The electrophoretic force on the fragment which has a long direct repeat makes them \*\* - hybridize in front of the fragment which has a short direct repeat. in this way, the indicator of the fragment is carried out to detection, and it is specific -- when the address is overly carried out to the detailed location, those sizes can be measured with the electrophoresis potential or power level which making it overly \*\* - hybridize from a detailed location takes them. Probably, it will also be possible to perform polymorphism analysis of equivalent electronic restriction fragment length.

By referring to in the unrestricted example of the following related with manufacture and application of an APEX device, this invention is further indicated in a detail here.

The formula of the buffer solution in the following examples, a solution, and a culture medium Jay Sambrook (J. Sambrook), I EFU flysch (E. F.Fritsch), and tee Maniatis (T. Maniatis) -- "-- molecular cloning: -- A laboratory manual (Molecular Cloning:A Laboratory Manual)" -- the 2nd edition New York, the Cold Spring Harbor Laboratory press (Cold Spring Harbor Laboratory Press) company of a cold spring harbor (Cold Spring Harbor), It is indicated in 1989.

IV. example example 1: Composition and qualification of an oligonucleotide The synthetic DNA probe was produced on the applied biotechnology SUSUTEMUZU (Applied Biosystems) automatic DNA synthesizer using idiomatic phospho RUAMIDAUTO chemistry. OIGOMA was designed so that either of the 5'- amino or 3'-ribonucleosides might be contained. Introducing a 5'-functional group by using ABI amino link (Aminolink) 2 reagent, 3' functional group is RNA. It introduced by starting the composition from CPG exchange. A 3'-ribonucleotide end can be converted into end dialdehyde by the periodate oxidation method which reacts with a primary amine and can form a CIF base.

A reaction condition dissolves underwater the :20-30C.D. oligomer which is as follows to last concentration 10D/mul. The 0.45M sodium periodate (it newly prepares in water) of the 0.1M sodium acetate of 1 capacity, pH5.2, and 1 capacity is added. The reactant is agitated at the bottom of a dark place, and a room temperature for at least 2 hours, and it incubates. The load of the reaction mixture is carried out on the sephadex G-10 column (Pasteur pipette, 0.6x5.5cm) which equilibrated by 0.1M sodium phosphate and pH7.4. A 200micro \*\* 1 fraction is extracted, the spot of the aliquot of 2microl is carried out on thin-layer chromatography (TLC), and a (ultraviolet-rays UV) absorption fraction is saved.

The following oligomer contains the 3'-ribonucleoside end (U). :

```

ET-12R      5'-GCT AGC CCC TGC TCA TGA GTC TCU
CP-1        5'-AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAU
AT-A1       5'-CTA CGT GGA CCT GGA GAG GAA GGA GAC TGC CTG U
AT-A2       5'-GAG TTC AGC AAA TTT GGA GU
AT-A3       5'-CGT AGA ACT CCT CAT CTC CU
AT-A4       5'- GTC TCC TTC CTC TCC AGU
AT-A5       5'- GAT GAG CAG TTC TAC GTG GU
AT-A6       5'- CTG GAG AAG AAG GAG ACU
AT-A7       5'- TTC CAC AGA CTT AGA TTT GAC U
AT-A8       5'- TTC CGC AGA TTT AGA AGA TU
AT-A9       5'- TGT TTG CCT GTT CTC AGA CU
AT-A10      5'- CAT CGC TGT GAC AAA ACA TU

```

Generally the oligomer containing 5' amine radical reacts with the fluorophore like Texas Red (TR, 590nm excitation, 610nm fluorescence). To a primary amine, reactivity of a sulfonyl chloride is dramatically high and it forms stable sulfonamide association.

: which produces Texas Red-DNA conjugate as the following -- the Texas Red sulfonyl chloride (molecular PUROBUSU (Molecular Probes)) was dissolved in dimethylformamide (DMF), and it considered as the last concentration of 50mg (80mM)/ml. Oligomer was dissolved in 0.4M sodium bicarbonate and pH 9.0-9.1, and it was referred to as last concentration 1 O.D./mul (21 serious condition 5.4 mM(s)). In the minute test tube, oligomer 10microl and Texas Red 20microl were doubled. It was made to react under a dark place for 1 hour. The reaction was quenched by ammonia or the hydroxylamine, the sample was freeze-dried, and PAGE refined (Sambrook et al. (Sambrook), 1989, above-shown).

The 5'-amino terminus is contained in the following oligomer. :

```

ET-21A      5'-Amino-TGC GAG CTG CAG TCA GAC AT
ET-10AL     5'-Amino-GAG AGA CTC ATG AGC AGG
ET-11AL     5'-Amino-CCT GCT CAT GAG TCT CTC
T-2         5'-Amino-TTT TTT TTT TTT TTT TTT T
RC-A1       5'-Amino-CAG GCA GTC TCC TTC CTC TCC AGG TCC ACG
            TAG
RC-A2       5'-Amino-CTC CAA ATT TGC TGA ACT C
RC-A3       5'-Amino-GGA GAT GAG GAG TTC TAC G
RC-A4       5'-Amino-CTG GAG AGG AAG GAG AC
RC-A5       5'-Amino-CCA CGT AGA ACT GCT CAT C
RC-A6       5'-Amino-GTC TCC TTC TTC TCC AG
RC-A7       5'-Amino-GTC AAA TCT AAG TCT GTG GAA
RC-A8       5'-Amino-ATC TTC TAA ATC TGC GGA A
RC-A9       5'-Amino-GTC TGA GAA CAG GCA AAC A
RC-A10      5'-Amino-ATG TTT TGT CAC AGC GAT G

```

example 2: the address is possible on the electronics target on the trial device which carried out micro processing -- super- -- the detailed location-poly lysine method The detailed location was overly processed from the minute capillary tube (0.2mmx5mm). The polymerization of the capillary tube was filled and carried out by the 18-26% polyacrylamide containing a 0.1-1.0% poly lysine. The unit was attached for the superfluous capillary tube, air foam was removed so that a trap might not be carried out into this tubing, and the die length of tubing was standardized. The up buffer-solution container with a common capillary tube was divided, and the capillary tube was mounted so that it might have each lower buffer-solution container. The platinum wiring electrode was contained in each lower buffer-solution reservoir.

the address is possible in the up front face of the detailed capillary tube in an up reservoir -- I thought that it was overly a detailed location. The upper part and a lower reservoir are filled with 0.1M sodium phosphate and pH7.4, using Biorad (BioRad) 500 / 1000 power feeder, it was fixed 0.05mA and play actuation was carried out for 10 minutes. It added with the pipet to the up reservoir which switched on the power source, and electrophoresis of about 2micro (0.1O.D.) of the periodate oxidation ET-12R prehension arrays n was carried out for 2 to 5 minutes with the fixed current. This ET-12R prehension array is condensed and covalent bond is overly promptly carried out to the primary amine of a detailed location front face. Subsequently, electrophoresis of the polarity was reversely carried out and carried out for further 2 to 5 minutes this time so that a trial capillary tube might be deflected by negative. Although DNA which carried out covalent bond overly remained in the detailed location, each extant \*\*-joint DNA array was flipped.

The up buffer-solution reservoir was attracted and it rinsed with the buffer solution. It decomposed and the instrument mounted a new related trial device. It was re-filled up with this reservoir and the complementary DNA array which carried out fluorescent labeling, i.e., ET-10 AL-TR, was added. the just deflected trial -- in the detailed location, oligomer was overly condensed in electrophoresis for 2 to 5 minutes by 0.05mA constant current. The polarity was carried out reversely and the uncombined complementary strand was removed. This trial device was removed and the speculum was carried out with the EPI fluorescence microscope. The negative control about a \*\*-specific binding replaced ET-10 AL-TR with \*\*-complementary DNA array ET-21 A-TR, and performed it like the above. a capillary tube -- the cross section of a detailed location front face was overly inspected under the Jenna (Jena) EPI fluorescence microscope equipped with the HAMAMATSU ICCD camera imaging system (Hamamatsu ICCD camera imaging system). The complementary ET-10 AL-TR array having hybridized on the connective object, and having hybridized the result of fluorometric analysis, even when a /array is caught and it makes negative deflect potential was shown. The ET-21 A-TR \*\*-complementary sequence was not held on a trial device front face, when potential was carried out reversely.

example 3: the address is possible on the electronics target on a micro-processing trial device -- super- -- detailed location-succinimidyl acrylic-acid method This example indicates another adhesion chemistry which carries out covalent bond to the 5'-end of an oligonucleotide. The capillary tube was processed like the above except replacing the poly lysine with acrylic-acid succinimidyl (molecular PUOBUSU (Molecular Probes)) 1%. Since especially the succinimidyl ester used for making a primary amine react was unstable in the field exceeding pH8.0 relatively, this capillary tube was finished fresh. This capillary tube was mounted like the above and the reservoir was filled with 0.1M sodium phosphate and pH7.4. Play actuation of this capillary tube was carried out in 0.05mA. 5' -- ET-10AL (0.1O.D.) 2 [ about ] containing - amino terminus -- microl was added with the pipet to the up reservoir, turning on a power source, and electrophoresis transport was performed for 2 to 5 minutes. The polarity was reversely carried out so that a trial device might deflect to negative, and electrophoresis was performed for further 2 to 5 minutes. Although the \*\*-association DNA was repelled, DNA which carried out covalent bond overly remained in the detailed location.

The up buffer-solution reservoir was attracted and it rinsed with the buffer solution. The reference trial device was removed and a new reference device was mounted. The reservoir was filled again, fluorescent-labeling complementary oligomer ET-11 AL-TR was added, and electrophoresis was performed like the above. The negative control of a \*\*-specific binding replaced ET-11 AL-TR with \*\*-complementary DNA array ET-21 A-TR, and performed it like the above.

Having hybridized the fluorometric analysis of each trial device, even when complementary ET-11 AL-TR hybridizes in a prehension array (ET-10AL) and changes a polarity to negative was shown. \*\*-complementary sequence ET-21 A-TR did not overly remain in a detailed location, when a polarity was



carried out reversely.

Example 4: Fluorescence DNA / coloring matter detection process controlled electronically The specific coloring matter like an ethidium bromide (EB) becomes fluorescence dramatically, when it combines with double stranded DNA (intercalation). When it combines with double stranded DNA, fluorescence and binding affinity are large, but; this coloring matter gives off low fluorescence, when it has compatibility also in a single stranded DNA a little and combines with it. The following examples show how DNA / coloring matter detection process controlled electronically can be developed.

Examples 2 and 3 were made to prepare and hybridize a capillary tube trial device like a publication. an ethidium bromide (EB) is added to buffer solution (- the 0.05mM EB last concentration), and a trial device is deflected to negative -- making -- hybridization -- and it un-hybridized -- EB (just electrification) was overly condensed on the both sides of a detailed location. The trial device was observed with the EPI fluorescence microscope by 550nm excitation and 600nm fluorescence.

Hybridization and the red fluorescence of the both sides which \*(ed) - hybridized strong from EB by which the detailed location was overly condensed were shown.

The trial device was mounted again, it deflected to the forward constant potential of 0.05mA and 0.03 volt-time amount, and EB was removed selectively. it did not hybridize -- although the fluorescence of a detailed location was overly reduced, it hybridized -- the detailed location overly held EB fluorescence of a high level dramatically. The following solved and the result was obtained. :

捕捉                                      標的                                      標準化シグナル

ET-10AL                      ET-11AL(正)                      200>

ET-10AL                      ET-21A(負)                      1

The fluorescence signal was measured using the ICCD imaging KANRA system, and expressed the fluorescence intensity of a peak. The ratio of a signal to a noise will exceed 1000 times, when the whole fluorescence signal area is integrated. This raises the ratio of a signal to a noise and is proving the approach about the dynamic range of the DNA assay using in TAKA rating coloring matter.

Example 5: Location in which the address is possible on the electronics target on a metal substrate Aluminum (aluminum) and golden (Au) wiring (0.25mm and Aldrich (Aldrich)) were made to react with the 10% 3-aminopropyl triethoxysilane (APS) in toluene. The APS reagent reacted easily with the oxide on a surface of metal, and /hydroxyl, and formed association between oxide and/or hydroxyl, and a primary amine. It is not necessary to process aluminum beforehand. Golden wiring was given to the electrolysis in a 5xSSC solution, and the oxidizing zone was made to form. As an exception method, metal wiring can oxidize by the perchloric acid bath.

: which performed the APS reaction as the following -- wiring was cut to 3 inches and put on the glass plate. Toluene was added and temperature was thoroughly made into 50 to 60 degree C for this wiring on the bonnet and the heating plate. APS was added and it considered as the 10% of the last concentration. The solution was mixed and the reaction was continued for 20 minutes. It rinsed 3 times with the toluene of abundant capacity, it rinsed 3 times in the alcohol of capacity abundant subsequently, and dried in 50-degree-C oven.

Subsequently, APS processing wiring can make an aldehyde able to react and can make a CIF base form. As indicated in other locations of a description, periodate oxidation of the connective object ET-12R was carried out. The electrode was installed into the reservoir of the deaerated water. power . -- it was fixed 05 mA and supplied for about 30 seconds. Activation ET-12R was added promptly. Power was supplied, the liquid was attracted, it added and fresh water was attracted again. The electrode of a trial (it just deflects) and contrast was installed into the hybridization buffer solution (HB, 5xSSC, 0.1% SDS) containing the fluorescent-labeling component DNA and ET-10-TR. After 2 minutes, the washing buffer solution (1xSSC, 0.1%SDS) washed the electrode 3 times for 1 minute each, and it was observed according to fluorescence (590nm of excitation, 610nm of fluorescence).

It is shown that ET-12R carried out coupling of the result to the front face of a trial metal specifically. The contrast electrode was not so although the test electrode was fluorescence. The nonspecific adsorption of DNA to a metal was checked when SDS in the hybridization buffer solution existed. Adhesion in the golden substrate by electrolysis and the continuing APS processing were effective. The obtained signal was more notably [ than what was observed with \*-gold oxide ] strong. In this example, with the connective object, functional-group addition could be carried out chemically, and the surface of

metal could be induction-ized in the still more important thing, and the thing which is insulated from a solution and which are not things was shown in it. The APS method expresses one sort in much available chemistry in which DNA-metal conjugate is made to form.

Example 6: Fluorochrome detection process-metal wiring controlled electronically The DNA-aluminum electrode substrate was prepared and the example 5 was made to hybridize like a publication. As contrast, the hybridized DNA-aluminum electrode which was not reached and hybridized was processed with unguided-ized aluminum wiring. Added the ethidium bromide (EB), negative was made to deflect the solution and a trial DNA electrode, and coloring matter was attracted. The solution was attracted and the new buffer solution was added. The speculum of the surface of metal was carried out under the microscope.

A device is re-mounted and electropositive potential is supplied for predetermined electrical-potential-difference 1 hour. The buffer solution was attracted and the electrode was observed according to EPI fluorescence. This was repeated until the significant difference arose in the fluorescence between the hybridized surfaces of metal which were not reached and hybridized.

捕捉                      標的                      標準化シグナル

E T - 1 2 R              E T - 1 0 A L (正)      > 1 4 0

E T - 1 2 R              なし(負)                  1

Although the fluorescence of the surface of metal which was not hybridized was reduced, the hybridized surface of metal held fluorescence. The fluorescence signal was measured using the ICCD camera imaging system, and expressed the fluorescence intensity of a peak. The ratio of a signal to a noise will become >>1000 time when the whole fluorescence signal area is integrated. So, this example shows that this approach goes up the signal ratio to a noise, and that the range of assay is dynamic. Being obtained even if the same result uses a capillary tube gel spacial configuration shows that the electrochemistry effectiveness does not influence for the engine performance of assay notably.

Example 7: Active programmable electronic matrix (APEX)-micro machine processing The radial array of 250-micrometer capillary tube location in which the six addresses are possible is detailed from a plastic radical plate. - It was processed. This device has the common up reservoir and the lower reservoir which separated each \*\* detailed location separately so that the address might be possible. the unique oligomer array connective object was manufactured from the polyacrylamide which constructed the bridge over altitude by said approach carried out -- specific -- you made it located [ overly ] in a detailed location, and it has joined together. a trial -- although the detailed location overly has positive charge, other locations have electronegative potential, in order to prevent a \*\*-specific interaction.

This array is washed and is made to hybridize with the DNA probe complementary subsequently which carried out fluorescent labeling. This array was washed, the superfluous probe was removed and, subsequently it observed under the EPI fluorescence microscope. the address was carried out specifically -- only the detailed location was overly fluorescence. This process is checked by hybridization with the probe which carried out the indicator by other fluorescence radicals repeatedly with the connective object of the others in one place else.

The DNA array was specifically installed in the position by the bridge formation with other locations which may be disregarded. The micro matrix which has the unique array of 100 - numbers partly is processible into a position with this.

In order to choose the suitable plastic plate of the low background, a different substrate was examined about the fluorescence property in those 600nm. Plastics was examined in an EPI fluorescence microscope imaging system and fluoro meter. The fluorescence decipherment value acquired from the list of substrates and LS50B fluoro meter is indicated to the following tables. :

プラスチック基板	610nmにて 5秒間の強度
ABS 黒色	0.140
白色	6.811
ポリスチレン	7.955
アクリル樹脂 透明	0.169
白色	51.77
薄い色	0.151
黒色	0.035
トランスホワイト	51.22
UHMW 黒色	0.743
白色	
デルリン 黒色	1.834
白色	61.39
TFE	96.05

ポリプロピレン 白色	22.18
自然色	25.82
ポリカーボネート 透明	11.32
薄い色	3.103
白色	45.31
黒色	0.156
PVC 灰色	2.667

This experiment shows that it has background level with lowest black acrylic, ABS, and polycarbonate. Example 8: Active and programmable electronic matrix (APEX)-micro lithography processing 50-around micrometer detailed location (refer to [drawing 3](#)) of the matrix of 8x8 on a silicon wafer (64 parts) was designed and processed, and packaging was carried out with the switch box (about a detail, it is referring to the device processing section). Amelioration of the several sorts of ingredients and the process which are indicated how was performed, and the sensibility and active nature of an APEXDNA chip device were raised.

8a) Selection of the maximum upper coat Making all the front faces of a chip react is included in an APS (3-aminopropyl triethoxysilane) process. It depends for the sensibility of this initial functionalization process on the relative reactivity of the various matter on a chip front face. In order to decrease the functionalization to the field which overly surrounds a detailed location, and secondary DNA adhesion, a reactant low ingredient is more nearly required than SiO<sub>2</sub> or a metallic oxide. A photoresist and silicon nitride were examined. The different maximum upper coat was given to the silicon nitride chip. This chip is periodate oxidation Polly A after inspecting according to EPI fluorescence and processing with APS subsequently. Covalent bond of the RNA array (a sigma (Sigma) company, molecular weight 100,000) was carried out. This chip was made to react for 5 minutes at 200nM solutions of Texas red indicator 20 serious condition (T2-TR) in the hybridization buffer solution, and 37 degrees C. The chip was washed once in 1xSSC 3 times in the washing buffer solution. The chip was inspected by the fluorescence of 590nm excitation and 610nm fluorescence.

As compared with the silicon dioxide, like very low reactivity and a photoresist ingredient, since it originally was not fluorescence, silicon nitride was chosen to APS. Moreover, it is possible in other approaches like UV burning of background area.

8b) Physical property of APEX The finished matrix chip was inspected visually using the probe test station (Probe Test Station) (micro manipulator model 6000) which attached BII-, - El microscope, and the CCD camera. The chip was examined about the continuity between a trial pad and an external contact pad. This was performed by contacting a pad and the manipulator probe chip connected with the multimeter. With the continuity, it was checked that this pad is etched into a surface of metal.

Subsequently, the pad was checked about the stability under an electronic environment. It was estimated that metal wiring could be treated to 1mA under the usual desiccation conditions.

One drop (1-5microl) of buffer-ized solution (1xSSC) was added with the pipet to 8x8 matrices. It is maintained with surface tension in the same location, a liquid drying an external contact pad field. The one probe chip was contacted to the contact pad, and the one more probe pad was contacted into the liquid. In maximum electrical-potential-difference 50V, the current was gradually raised to 50nA(s) using the HP6625A power feeder and the HP3458A multimeter.

The first processing consists of a silicon substrate, a silicon-dioxide insulating layer, aluminum deposition, patterning, and the silicon nitride maximum upper layer.

An aluminum metal and the silicon-dioxide layer between the layers of silicon nitride are contained in the second processing process. A silicon dioxide and aluminum have the physical property of compatibility more, form a better chemistry interface, and offer stability and a strong chip more rather than what was manufactured according to the first processing process.

8 (c) DNA adhesion The matrix chip of 8x8 was functionalized with the APS reagent of example 5 publication.

Subsequently, the chip was processed by periodate oxidation Polly ARNA (a sigma (Sigma) company, average molecular weight 100,000). The chip was washed in the washing buffer solution (WB), and superfluous RNA which was not reached and combined was removed. Although the coat of the whole chip was carried out according to a prehension array by this process, the very high consistency existed in the surface of metal exposed rather than the field covered with the nitride. The chip was made to hybridize for 5 minutes at 200nM solutions of T2-TR in the hybridization buffer solution (HB), and 37 degrees C.

Subsequently, ordinary temperature washed for 1 minute respectively once in 1xSSC 3 times in WB. The chip was inspected by the fluorescence of 590nm excitation and 610nm fluorescence.

The metal field which was able to be extended shone to fluorescence and had the configuration of the pad (overly detailed location) of 50 micrometer around. The boundary of a low fluorescence intensity and/or a low infinite form showed that some pads had not spread thoroughly. In such a case, performing plasma etching several [ further ] times will be recommended.

8 (d) Hybridization controlled electronically active hybridization -- the chip from example 8c -- using -- one piece -- specific -- it carried out by overly just deflecting a detailed location. This is performed by using the electrode of external \*\*\*\*\*, using the switch box which remained and to which a deflection overly also makes a detailed location negative automatically. The buffer solution of 3microl was placed only on the matrix pad (overly detailed location). - T2-TR of a sink and 0.1 picomoles was added for the current of 1-5nA in this solution for several seconds. The liquid was removed, the chip was dried and it inspected about the Texas Red fluorescence of 590nm excitation and 610nm fluorescence. it just deflected -- specific -- only the detailed location was overly fluorescence. the others on an APEX chip are specific -- this experiment was overly repeated several times using the detailed location. in addition, one piece -- the fluorescence DNA of a detailed location is overly \*(ed) - hybridized electronically -- making -- subsequently -- the first location -- negative -- and the thing of the object for which a detailed location is overly just deflected -- one more piece -- it was made overly to move to a detailed location 8e) Processing of addressing and the device which are controlled electronically The 8x8APEX matrix was functionalized with APS like the above. Oligonucleotide connective object CP-1 was activated by the periodate oxidation method. The detailed location was overly just deflected within the matrix, and it made negative deflect four things which remain.

2micro of buffer solutions I was put on the matrix, and the current was passed. It added and connective object CP-1 was electronically condensed in the shown location. The liquid was removed, the buffer solution washed this chip simply, and 2micro of buffer solutions I was placed on this chip. Again, the sink and T2-TR2 picomole were added for the current for several seconds. After a short time, the liquid

was removed and this whole chip was washed 3 times by WB. The chip was dried and it inspected about fluorescence.

The result shows that that all detailed locations are overly fluorescence deflected to forward [ four ]. this example -- positioning in addressing with an overly alternative detailed location in a specific binding body, and the detailed location of an adhesion array, covalent bond, and induction-izing of a complementary target sequence -- the specific hybridization to a detailed location is overly shown.

8f Hereditary typing of an APEX chip The DNA connective object which has a specific 3'-ribonucleoside end in HLA gene dQa of polymorphism was compounded. This connective object was activated by the periodate oxidation like the above. Like the above, the reverse complementarity object was compounded by the 5'-amino terminus, and Texas Red and rhodamine \*\*\*\* carried out conjugate to the fluorophore like BOJIPI coloring matter. A detailed location is overly functionalized by the primary amine by processing with APS like the above.

The solution of several microl was placed on the 8x8 matrix. specific -- by overly just deflecting a detailed location, the address of the detailed location is carried out, added the periodate oxidation DNA oligomer of -0.1 picomole, it was made to move to the location, and covalent bond of it was overly carried out. The polarity was reversed and the connective object molecule which was not combined was removed. This repeats about other connective objects of overly everything but a detailed location by which the address was carried out until all unique adhesion connective objects combine with a chip. subsequently -- at the same time it makes each fluorescent-labeling complementary sequence hybridize a chip and determines the singularity of a coupling reaction -- all -- ADORUSU -- the detailed location was overly visualized. the address was carried out on the same (90 degrees C for the inside of 0.05% SDS, and 10 minutes) chip from which it was made to denaturalize electronically and complementary oligomer was removed -- a detailed location overly hybridizes with the non-indicator target DNA or genomic DNA. Detection minded fluorochrome detection assay, as described above on the descriptions. Probably, the result shows that the address was specifically carried out with the connective object with an overly unique detailed location. it deflected negative -- nonspecific association to a detailed location can overly be disregarded -- I will come out. The device which is stable also under denaturation conditions as for this device and the connected connective object chemistry, and the address was so carried out, and was processed is reusable. The electronic approach of denaturing a hybrid will make the time amount which a current is raised and/or passes it increase.

Example 9: Electronic strict control 9A Single point mutation in 15 serious-condition Ras-12 probe The capacity of the device which influences electronic strict control of a high level was proved by the Ras-12 oncogene model system which used 15 serious-condition probe. Mismatching of the single base pair in DNA duplex produces only slight instability in a hybrid pair as compared with the double strand which carried out involution. It is made to denaturalize by Tm with this slight instability slightly lower than the double strand which caused and carried out involution of the mismatching double strand. To the pair which carried out involution of both, it is strict and this pair (involution and mismatching) will hybridize the pair which carried out mismatching when [ optimal ] hybridizing only at lower effectiveness. Probably, the hybridization signal from mismatching will be lower than the signal from the pair which carried out involution a little. In the conventional hybridization method, the probe of 8 serious-condition - 21 serious-condition range performs single point mutation analysis. The probe of 10 serious-condition - 20 serious-condition range is used most frequently. When longer than 20 serious condition, even if a mutation probe is shorter than 8 serious condition, or it uses an approach for any to be reliable, it becomes very difficult to discriminate what carried out involution from mismatching. This is because there is almost no difference in involution and the hybridization signal between the pairs which carried out mismatching. The typical approach of the hybridization and strict control used by point mutation analysis makes temperature and salt concentration reliance. this invention persons found out that strict control is influenced also with electrophoresis potential.

30 serious-condition target sequence on a trial device which overly adhered to the detailed location was made to hybridize electronically 15 serious-condition point mutation specific probe in the example of Ras-12. Negative was made to deflect the polarity of a detailed location and the predetermined time amount this hybrid was overly given to the fixed current which offers the predetermined power level which denatures what carried out mismatching, without influencing what carried out involution thoroughly.

the following arrays -- 250 micrometer front face of each -- it compounded and examined on the three-set trial structure of overly having a detailed location.

Ras-G      5' -GGT GGT GGG CGC CGG CGG TGT GGG CAA GAU-3' -

Adhesion array :      超微細位置

It comes out.

Reporter probe array (it is an indicator at Texas Red) :

Ras-1      3' -CC-GCG-GCC-GCC-ACA-C-5' - (TR)

Ras-2      3' -CC-GCG-GCA-GCC-ACA-C-5' - (TR)

Ras-3      3' -CC-GTG-GCA-GCC-ACA-C-5' - (TR)

It comes out.

The device was processed from the capillary tube, as described above on the descriptions. periodate oxidation of adhesion array Ras-G and Ras-T was carried out, and the address was carried out -- the detailed location was made overly to carry out covalent bond

subsequently, Ras-G -- the detailed location was made overly to hybridize with Ras-1, Ras-2, or Ras-3 Involution of Ras-1 was thoroughly carried out to Ras-G. One base pair of Ras-2 is mispairing (G-A). Ras-3 are 2 base-pair mispairing (G-A and G-T). G-A mispairing is the most difficult to produce only the lowest instability to DNA duplex, but to discriminate from perfect involution so.

Idiomatic hybridization was performed first, the detailed location was overly inspected in fluorescence, and it measured what range of a complementary sequence has hybridized. The trial device (detailed capillary tube) was re-mounted, and, subsequently electronic hybridization was performed. All trial devices were given to the same electronic strictness by deflecting them with electronegative potential (fixed current) until the hybrid which carried out mispairing was removed thoroughly, without having big effect on the hybrid which carried out involution thoroughly. : which shows an approach and a result below -- conventional hybridization method: it hybridizes in 5during 15 minutes xSSC at -40 degrees C - - making -- 20 degrees C of - each -- for 5 minutes and the inside of 1xSSC -- 3 times -- washing -- - fluorometric analysis -- carrying out -- : which observes the signal ratio of the perfect involution (Ras-G/Ras -1) to -1bp mispairing (Ras-G/Ras -2) -- about 10 to 1.

electronic strict control (ESC) -- law: it hybridizes in 5 minutes and in 5xSSC at -20 degrees C -- making -- "- with no washing process"

- 150 volts (V) -- the electronic strictness of 0.15mA (mA) -- for 4 minutes (20 degrees C) -- application -- carrying out -- - fluorometric analysis -- carrying out -- : which observes the signal ratio of the perfect involution (Ras-G/Ras -1) to -1bp mispairing (Ras-G/Ras -2) -- >100 pair 1 The perfect result about all experiments is shown in drawing (15) in graph. ; which shows that these results can use only electrophoresis potential for strict control in a DNA-hybridization reaction, however ESC also show that conventional hybridization effectiveness higher than a hybridization method and a conventional high discernment ratio are offered. In addition, the strict control of each each [ ESC ] which could overly apply to the detailed location and became independent in the same bulk solution is offered.

(9B) 7 serious condition and single point mutation analysis using 22 serious-condition probe The probe of both the 7 in a serious condition which was widely different, and 22 in a serious condition was prepared, and the advantage of electronic hybridization and ESC was further proved to be the normal size range usually used by point mutation analysis. Pair formation of the point mutation specific oligomer probe carried below can be carried out so that the hybrid obtained may have mispairing of 0, 1, or 2 bases. The detailed location was made overly to carry out coupling of the complementary oligomer array, and it was made to hybridize like the above. with [ predetermined to the fixed current which offers the predetermined power level which denatures mispairing, without overly reversing a polarity in a detailed location (it deflecting to negative), and removing perfect involution for the hybrid ] time amount -- having carried out .

The detailed location overly adhered and Ras-G or Ras-GA oligomer (shown below) used these as a target sequence. As indicated it to be [ where / of this description ], the indicator of the series of Ras specific oligomer the 22 in a serious condition shown below and 7 in a serious condition was carried out by the Texas Red fluorophore. "The base which drew the underline, and the base of a bold letter" are \*- involution and/or \*. - The location which may carry out involution is shown. :



```

Ras-G          5' -GGT GGT GGG CGC CGG CGG TGT GGG CAA GAU
Ras-GA         5' -Amino-GGT GGT GGG CGC CGG CGG TGT GGG
                CAA GA
Ras-22C-TR     (TR) -5' -TGC CCA CAC CGC CGG CGC CCA C
Ras-22A-TR     (TR) -5' -TGC CCA CAC CGA CGG CGC CCA C
Ras-TA         (TR) -5' -TGC CCA CAC CGA CGG TGC CCA C
Ras-7C         (TR) -5' -ACA CCG C
Ras-7A         (TR) -5' -ACA ACG C

```

The trial device was processed from the capillary tube, as described above in this description. Covalent bond of oligomer target Ras-G or Ras-GA was overly carried out to the detailed location. Subsequently, it was made to hybridize with complementary Ras-22 C-TR of perfect one 22 serious condition which overly carried out the indicator of the detailed location by Texas Red. It hybridized with Ras-22-TA which is Ras-22 A-TR; which is 22 serious condition of \*\* a second to which one base pair is overly carrying out mispairing of the detailed location (G-A), or 22 serious condition in which two bases are carrying out mispairing (G-A and G-T).

The trial device described above in this description was simultaneously operated in the duplex channel format which experiences simultaneously both currents or power level with the overly same detailed location. The amount of the complementary sequence which was made to hybridize a trial device with a conventional method first, inspected the detailed location in fluorescence and overly hybridized it was measured. By the pair, electronic hybridization was performed using the trial device, and time amount was controlled by the fixed current until the mispairing hybrid was removed without affecting a perfect involution hybrid greatly. Typically, BAIORADO (Bio-Rad) 1000 / 500 power feeder was set as 0.02-0.1mA, and experimented with the fixed current by 0.02-0.04 volt-time amount. The device was separated and the trial device was observed according to EPI fluorescence on the Jenna (Jena) microscope which attached the silicon consolidation CAD camera (HAMAMATSU (Hamamatsu)). The image was processed by the HAMAMATSU AGASU 10 image processor (Hamamatsu 10 image processor), and it recorded with the Sony video printer (Sony Video Printer). When requiring the further electronic strictness, this capillary tube was re-operated.

Discernment of single base pair mispairing was performed by 7 serious condition like the above.

However, the device was operated all over the cooling box of four to 6 degree C rather than the room temperature with low [ the / Tm ].

The result showed that electronic hybridization and strict control could identify single base pair mispairing using both 7 in a serious condition and 22 in a serious condition. Involution: The mispairing ratio was larger than 100:1 or it. This signal: More generally than what was reported by one which controls strict conditions using temperature and ion concentration of hybridization methods, the noise ratio was good.

Since the proton of IMINO of G participated in hydrogen bond with A which can stabilize a double strand even if, even if G-A mispairing was the most stable mispairing, as for electronic strict control, mispairing of 1 base G-A was discriminable from perfect involution.

The consumption calculated value and measured value of power showed only change which can be disregarded in temperature, but it was proved that strictness is not overly caused by the temperature change in a detailed location.

The thing like the above which are hybridized passively and for which a detailed location did not overly show discernment between involution and mispairing proves that diffusibility does not cause discernment.

Moreover, these examples can conquer the main failures over the compound hybridization technique of a large scale in which each detailed location can have each strict control, therefore is limited to single ordinary strict level. Moreover, electronic strict power level can be related with thermal melting point (Tm) data, and an anticipation electrical-and-electric-equipment melting point (Em) curve and equality can also be created.

(9C) Electronic hybridization in the high genome background The target DNA array of an example usually consists only of the total DNA of the very small ratio in a genomic DNA sample. By condensing the total DNA in the very small location on APEX and a device, this invention raises the effectiveness of

target hybridization under existence of the superfluous hetero DNA.

The adhesion array which has carried the 5'-amine radical was made to adhere to 22%PAGE and the trial device which contains acrylic-acid succinimidyl 1% in this example. The capillary tube was induction-ized by either of the ET-23AL or ET-11AL prehension arrays. The indicator of the target probe ET-12R was carried out by Texas Red. ET-12 R-TR will not be hybridized in an ET-11AL prehension array, although it will be hybridized to ET-23AL which is the array of a trial and contrast respectively.

Hetero genomic DNA and calf thymus DNA (CTDNA, sigma (Sigma) company) were dissolved, and it considered as water with a last concentration of 1mg [ /ml ], it ultrasonicated and heated, and this DNA was denatured. The sample was prepared in 0.5xTBE with a last capacity [ l ] of 100micro which contains the ET-12 R-TR target of 1010 copies with the denaturation CTDNA of 0, 0.1microg, or 1.0microg. This expressed 0, 1,000, or 10,000 times as many superfluous CTDNA as this as compared with Target DNA.

Play actuation of the trial device was carried out for 5 minutes in 0.03mA among 0.5xTBE using BAIORADO (Bio-Rad) 1000 / 500 power feeder. The trial device was set up so that the capillary tube of a trial and contrast could operate simultaneously under the same conditions strictly.

Attached the sample (100microl), for 5 minutes and electropositive potential were made to deflect a capillary tube in 0.03mA, and DNA was attracted. The polarity was reversed and all the ET-12 R-TR targets that did not pass and hybridize the same power were removed from the trial device front face. The buffer solution was attracted and the trial device was observed by fluorescence on the Jenna microscope (HAMAMATSU (Hamamatsu)) which attached the silicon consolidation CAD camera. The image was processed using the HAMAMATSU AGASU 10 image processor, and was recorded by the Sony video printer.

There was no difference between the absolute hybridization signal in existence of 100microl per 0.1microgCTDNA or un-existing, and a signal-noise ratio.

Signal reinforcement is equivalent and the signal was uniformly distributed over the service area.

That the signal is had priority and distributed around a capillary tube on the level of CT DNA of 100microl per 1microg shows that the prehension array is blocked or saturated. This artifact was easily got through by vibrating a polarity between hybridization processes. The pulse of the total DNA is carried out from there by this, and it could make the target hybridize more efficiently and uniformly towards a service area by it.

(9D) Passive hybridization-pair-electronic control hybridization Electronic control hybridization has nearby effectiveness well quicker than passive hybridization. Because, it is for the electric effectiveness in electronic control hybridization.

The capillary tube trial device was respectively finished in the ET-23AL and ET-11AL adhesion array as a trial and a contrast device. The hybridization solution with a capacity [ total / l ] of 100micro which contains ET-12 R-TR of 1x1010 copies with CTDNA 1microg was produced.

Passive hybridization: The one-set trial and the contrast device were put on the small test tube into which 100micro of 50-degree C hybridization solutions 1 was put, and were made to hybridize for 15 minutes. Subsequently, 1xSSC and 0.1%SDS washed the sample each for 5 minutes at 45 degrees C 3 times.

Electronic control hybridization: The trial device was mounted and play actuation was carried out for 5 minutes in 0.06mA. Subsequently, the buffer solution was attracted and 100micro of hybridization solutions 1 was added. The trial device was just deflected for 3 minutes in 0.06mA, reversed the polarity for the following \*\*\*\* 30 seconds, and it was again reversed for 3 minutes so that the device concerned might just become again. A negative one was made to deflect a trial device for 3 minutes, and it was washed electronically.

The active format of the effectiveness and extent of hybridization was dramatically better than the passive format. The absolute signal in an activity (electrical and electric equipment) format was more expensive than the signal in a passive format exceeding 100 times. The signal-noise ratio in an active format rose 10 times rather than the signal in a passive format. Active hybridization assay is completed in 10 or less minutes by the minimum actuation. A passive format requires several sorts of actuation of tubing and the buffer solution for - 30 minutes.

At a typical hybridization method, the probe of 2.5nM(s) is used for 90% of the completion of a reaction for 15 minutes by 3 times of C0t. Passive hybridization reaction dynamics will usually take - 4 hours to the experiment concentration of the probe [ of this invention persons ] of 0.17nM(s).

By active hybridization, it can be used by the low probe concentration used as the low background. It is



dependent on diffusibility, therefore a typical approach must move reaction dynamics using high concentration more. By the active approach, a sample can be condensed very a little, and this serves as very local probe concentration, it continues and can be made into very quick hybridization reaction dynamics.

Example 10: Hybridization in fluorescence DNA nano-structure The sensibility of the whole hybridization assay of a \*\*magnification mold is usually restricted by the background from nonspecific association. This is often main problems, when carrying out the indicator of the DNA probe using secondary complex with two or more reporter radicals or two or more reporter radicals. Therefore, assay limit of detection reaches only to a quite low place rather than the limit of detection of the actual or the proper of a reporter indicator (group) often reaches.

By using an electronic control hybridization method, this invention persons found out using the bead of a sub-micron or a nano-scale with dramatically powerful fluorescence for super-high sensitivity assay with an adhesion DNA probe. this invention persons were able to control motion of the DNA probe-fluorescence nano structure using free field electrophoresis. Since what was hybridized from the structure which was not hybridized by electronic strict control is discriminable on high level, it is DNA. The probe-fluorescence nano structure can go up hybridization sensibility notably. By electronic strict control, this invention persons can detect the nano structure of such high fluorescence, or two or more of other indicator models without the need of amplifying, with low copy number (50 to 1000 target). This was impossible at a conventional hybridization method and a conventional process until it resulted in current.

The nano particle of fluorescence and the fluoro forehead purchased from molecular PUROBUZU, Incorporated (Molecular Probes, Inc.). carboxymethyl latex SUFEA on which this particle put Texas Red or the fluorescence coloring matter like a fluorescein -- a cage -- \*\* This latex SUFEA can be obtained by the functional group from which the front face like an amine or an aldehyde differs. This particle can be used in size with a diameter of 0.01-5 micrometers.

1) Characterization of a fluorescence nano particle Non-modified and the nano particle by which amine qualification or aldehyde qualification was carried out have net positive charge. it made negative deflect these particles in electric field -- it overly moves towards a detailed location.

2) DNA adhesion chemistry to FURUO loss fair Coupling of the amine qualification termination can be carried out to the nucleic acid which has an end aldehyde group. Subsequently, it can be made to generate by compounding a DNA probe by the 3'-end riboside which oxidizes by the periodic acid method described above in this description.

The particle was saved as 2% suspension in distilled water. In 0.1M sodium phosphate and pH7.4, pipet addition was carried out and the aliquot of the fluoro forehead of the amine qualification red fluorescence of 0.02 to 1.0 micrometer was re-suspended. Periodate oxidation PORIRIBO-A of an excessive amount was added to the suspension. It was made to react at a room temperature and incubated for 90 minutes. PORIRIBO-A which washed this particle in 1xSSC and 0.1%SDS (0.15mM, a sodium chloride, a 0.015mM sodium citrate, 0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate, pH7.0), and carried out pipet addition, which was not combined and which it reached and was combined nonspecific was removed.

The DNA-FURUO loss fair in buffer solution was put on direct-current electric field. It is observed that this DNA-FURUO loss fair moves toward a positive electrode, and this shows that now the charge of the net is changing to negative. This is an approach simple, although it determines whether the DNA coupling reaction was successful, and simple. Probably, in a traditional hybridization method, it will be required to use a radioisotope indicator reporter probe, since the intense fluorescence from a particle will be blocked by one of hybridization signals.

3) DNA adhesion in a trial device The polymerization of the trial device was carried out by the polyacrylamide which can be made to react with a 5'-amine terminalization DNA probe continuously and which constructed the bridge over the altitude which contains acrylic-acid succinimidyl 1%. The adhesion of a prehension array and oligo-T was proved by hybridization with the complementary probe which carried out fluorescent labeling, and CP-1-TR. A trial device front face is very fluorescence, and this shows that this front face was derivatized in the prehension array.

4) The electronic hybridization of DNA-FURUO loss fair, and detection The hybridization reaction was performed in the structure which supports two capillary tube trial devices which share and have a common up reservoir and an independent lower reservoir. The reactant front face was exposed to the common up reservoir.

The trial device was mounted on this structure and play actuation was carried out for 15 minutes in 0.05mA 0.5xTBE. One trial device has the T2 complementary adhesion array, and another has the ET-10AL \*\*-complementary adhesion array. DNA-fluoro fair 1microl was added to the up reservoir. The trial device was just deflected for 5 minutes by .02mA, and DNA-FURUO loss fair (nano particle of fluorescence) was made to attract. In order to check that this particle exists on a front face, this trial device was scrutinized. A trial device is shortly deflected by negative, and the polarity was reversed so that the DNA-FURUO loss fair which was not hybridized might be flipped.

It was same between the trial and the contrast device. In spite of the passed electric energy, this particle was unremovable, also after trying repeatedly.

5) The passive hybridization of DNA-FURUO loss fair, and detection this invention persons thought that the electronic hybridization of a particle fixed or caught the particle in the surface gel matrix of a trial device, without being caught also by which theory and assumption. The DNA-FURUO loss fair passively hybridized in the adhesive array on a gel front face in this way must be more easily removed by electronic \*\*-hybridization.

A new trial device was mounted like the above. Pipet addition of the 0.05% suspension of DNA-FURUO loss fair was carried out at the up reservoir, and it was made to hybridize passively for 5 minutes. The buffer solution was attracted and the new 1xTBE buffer solution was added. Negative was made to deflect a trial device and the particle was flipped this time. The trial device was operated for 5 minutes in 0.02mA, and, subsequently was inspected according to fluorescence.

There was epicritic [ remarkable between the trial after performing for / ECS / a total of 10 minutes at a room temperature shortly, and the device of contrast ]. It was condensed by the single pocket although the signal was not distributed over homogeneity over the trial front face. This may show that the effectiveness of a surface adhesion array is restricted. It is improvable using a long spacer arm rather than it has hydrophobicity, a hydrophilic property, or the mixed property. This spacer is producible using other various spacer radicals which diaminohexan, an anhydrous cinnamic acid, and the field concerned are sufficient as, and are known.

Example 11: Electronic directive restriction enzyme cutting of a specific ds-DNA array The capacity for an APEX device to be able to perform restriction endonuclease cutting of a ds-DNA array selectively is proved using two examples. M13mp18 (it has XbaI limit part) and M13mp8 (it does not have the XbaI limit part) vector was used for these examples. These vectors are ordinarily used for many cloning and DNA sequencing processes.

In the 1st example, free field electrophoresis transport of a XbaI restriction enzyme in the electronic hybridization of an M13mp array to the specific detailed location on : (1) trial device and (2) detailed location and secondary prehension of the cutting fragment in a detailed location besides (3) are proved. In this example, the capacity of this device in which a self-assemble is possible is also proved by the specific binding body (an oligonucleotide prehension array, others).

The basic process in an approach is shown in drawing (16). four which carries out covalent bond to an oligonucleotide prehension array -- specific -- the detailed location (ML-1, ML-2, ML-3, and ML-4) was overly used. In order to carry out the delivery of the reagent (an oligonucleotide, a restriction enzyme, others), and in order to process a reactant, an electronic delivery system is used.

Transport in a ML-3 and ML-4 detailed location and adhesion of the transport, the covalent bond there, and the M13-2 oligonucleotide prehension array to the ML-1 and ML-2 detailed location of an M13-1 oligonucleotide prehension array are included in the first process. Since electrification of the nucleic acid is carried out to negative by pH>4, when electrophoresis is carried out in the buffer solution of the range of pH 5-9, they move toward the electrode which always just carried out electrification. the second process -- ML-1 -- the M13-1 prehension array of M13mp18 array overly in a detailed location -- and the free field electrophoresis transport and hybridization to this M13-1 array of M13mp8 array in a ML-2 detailed location are contained.

the third process -- a XbaI restriction enzyme -- ML-I (M13mp18) -- super- -- a detailed location and ML-2 (M13mp8) -- transport in a detailed location is overly included. Although XbaI cuts M13mp18 of ML-1, M13mp8 of ML-2 does not cut. The cutting fragment from ML-1 is conveyed to M13-2 array of ML-3, and is hybridized to it. As control of an experiment, free field electrophoresis was performed between ML-2 and ML-4. Since M13mp8 array of ML-2 is not cut, in ML-4, a fragment is not detected at all.

Various M13 adhesion arrays and probe arrays which were used by this example are prepared as described above in this description. These arrays are shown below. :

M13-C1      5' -CCA GTC ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG U

M13-C2      5' -GTA ATC ATG GTC ATA GCT GTT TCC TGT GTG U

MP18-40C    5' -GCA TGC CTG CAG GTC GAC TCT AGA GGA TCC CCG-  
GGT ACC G

MP8-40C     5' -TGC CAA GCT TGG CTG CAG GTC GAC GGA TCC- CCG  
GGA ATT C

MP18-R1     (TR) -5' -AAA TTG TTA TCC GCT CAC AAT TGC

MP8-R2      (F) -5' -ACA CAA CAT ACG AGC CGG AAG CAT

Adhesion of a process-1-M13 prehension array The APEX testing device of an amine activation viaduct (26%) polyacrylamide front face or a polycarbonate (five to 10 nm) porosity film front face which overly has 200 micrometers of detailed locations is used for this process.

An M13-C1 prehension array is the DNA oligonucleotide containing 3'-ribonucleotide of 31 serious condition. M13-C1 array is complementary at the 3'-end of M13 mp18 and M13mp8 single strand (+) vector. An M13-C1 prehension array is hybridized to all non-cutting M13 vectors, and it is designed so that it may join together strongly.

M13-C2 array is 31 serious-condition oligonucleotide containing 3'-ribonucleotide. M13-C2 is complementary to the part of M13 array of the cloning part containing a XbaI limit part to the upstream. An M13-C2 prehension array is hybridized in XbaI cutting M13 fragment, and it is designed so that it may join together strongly. M13-C1 and an M13-C2 prehension array -- APEX -- in order overly to carry out coupling to the amine derivative on a detailed location, it is activated by matrix oxidation. 3' ribonucleotide end is converted into an end aldehyde by the matrix oxidization which reacts with a primary amine and can form a CIF base.

A reaction condition is as follows. : M13-C [ of 10-200.D. ] 1 or M13-C2 oligomer is dissolved underwater, and it is referred to as last concentration 1OD/mul. 1 capacity and 1 capacity (it newly produces underwater) of 0.45M matrix sodium salt are added for 0.1M sodium acetate and pH5.2. Under a dark place, it agitates in ordinary temperature for at least 2 hours, and an incubation reaction is carried out. The load of the reaction mixture is carried out to G-sephadex 10 column (Pasteur pipette, 0.6x5.5cm) which equilibrated by 0.1M sodium phosphate and pH7.4. 200microl fraction is extracted, the spot of the aliquot 2microl is carried out on thin-layer chromatography (TLC), and a (ultraviolet-rays UV) absorption fraction is saved.

the address is possible for four top faces of an APEX trial device -- overly detailed -- it is indicated as location ML-1, ML-2, ML-3, and ML-4.

M13-C1 -- the following processes -- ML-1 and ML-2 -- covalent bond is overly carried out to a detailed location : The upper part and a lower reservoir are filled with 0.1M sodium phosphate and pH7.4, and it pre operates for 5 minutes by 0.05mA constant current using Biorad (BioRad) 500 / 1000 power feeder. - the chip of the electronic delivery system containing matrix oxidization M13-C1 oligonucleotide of a 0.1O.D. unit is installed in a lower reservoir.

An electronic delivery system is the plastic pipet chip specifically embellished in the platinum-electrode inside. 0.1mA -- an electronic delivery system -- negative -- (-) deflects and overly detailed -- location ML-1 and ML-2 -- forward -- (+) deflects. Electrophoresis of M13C-1 is carried out to ML-1 and ML-2 for 2 minutes in constant current, and it carries out covalent bond to a front face there. M13-C1 which did not react -- ML-1 and ML-2 -- a polarity is reversed for 4 minutes so that it may overly be removed from a detailed location.

the process as the above that C-M132 array is the same -- it is -- ML-3 and ML-4 -- it overly combines with a detailed location.

Process 2-M13 vector, a complementary sequence, and hybridization of a fluorescence reporter probe Since double stranded DNA is needed in order that restriction endonuclease may cut, cloning / limit part segment of single strand M13mp18 (6240-6280), and M13mp8 (6230-6270) must hybridize with a complementary DNA array. electronic hybridization -- using -- each and 40 serious-condition complementary fragment (MP18-40C array) -- ML-1/M13C-1 -- it overly hybridizes to M13mp18 vector on a detailed location -- making --;40 serious-condition complementary fragment (MP8-40C array) --

ML-2/M13C-1 -- M13mp8 vector on a detailed location was made overly to hybridize the electronics delivery system by which electronic hybridization contains M13mp18 of a 0.05O.D. unit for 2 minutes in 0.1mA -- negative -- it deflects to (-) -- making -- ML-1/MP13C-1 [ and ] -- super- -- a detailed location -- forward -- it carries out by deflecting (+). A polarity is reversed for 4 minutes and M13mp18 which was not hybridized is overly removed from a detailed location. the same process -- using -- M13mp8 vector -- ML-1/M13C-1 -- a detailed location is made overly to hybridize electronically

Subsequently, two sorts of different fluorescence reporter probes and electronics targets are made to hybridize M13mp18 and M13mp8 array. ML-1/M13C-1 -- M13mp18 vector on a detailed location is made overly to hybridize electronically with 24 serious-condition Texas Red indicator reporter probe (MP18-R1 array), and this is hybridized at the 5'-end of cloning / limit part. M13mp8 vector is made to hybridize electronically with 24 serious-condition fluorescein indicator reporter probe (MP8-R2 array), and this is hybridized at the 5'-end of cloning / limit part.

Limit cutting of M13mp18 vector using a process-3-XbaI restriction enzyme It can make neutrality ( $\text{pH}=\text{pI}$ ) or forward ( $\text{pH}<\text{pI}$ ) carry out electrification of many protein and enzymes to negative ( $\text{pH}>\text{pI}$ ) in the range of pH 5-9 depending on those isoelectric points (pI). Much restriction endonucleases have pI within the limits of 6-7. Probably, by pH higher than pI, these enzymes are carrying negative charge. therefore, when free field electrophoresis was performed in the buffer solution of  $\text{pH}>7$ , electrification of these enzymes was just carried out -- it overly moves to a detailed location -- I will come out.

In the case of much DNA modification enzyme like restriction endonuclease, it is always desirable to choose the buffer solution which offers pH with which quick electrophoretic mobility and the quick optimal enzyme activity balance. It is possible to have the rational enzyme activity of following both from a top [ pI ] and it in a certain case. according to selected pH, the thing which deflected to either forward or negative and which is overly moved toward a detailed location cuts these enzymes.

XbaI cutting of M13mp18 vector in ML-1 is performed as follows. an electronics delivery system -- using -- the beginning -- XbaI endonuclease -- ML-1/M13mp18 -- free field electrophoresis is overly carried out to a detailed location. the electronics delivery system which contains XbaI of 100 units in the buffer solution of pH7.6 for 2 minutes in 0.1mA is deflected to negative -- making -- ML-1/M13mp18 -- a detailed location is overly just deflected. Subsequently, a current is reduced to 0.02mA for 3 minutes. although an electronics delivery system is turned off -- 0.1mA -- for 5 minutes and ML-1/M13mp18 -- a detailed location is overly deflected to negative -- making -- ML-3/M13C-2 -- a detailed location is overly just deflected. next time -- XbaI and the fragment which was not hybridized -- ML-3/M13C-2 -- in order overly to remove from a detailed location -- ML-3/M13C-2 -- negative is made overly to deflect a detailed location, and an electronics delivery system is turned off and it is made to just deflect for 2 minutes in 0.1mA

the observation by the EPI fluorescence microscope -- ML-1/M13mp18 -- disappearance of the red fluorescence signal overly in a detailed location, and ML-3/M13C-2 -- it is shown that the red fluorescence signal in a detailed location overly exists, and it is proving that XbaI cutting of the M13mp18 vector was carried out. ML-2/M13mp8 which offers the same basic XbaI intercept method as negative contrast shortly -- it overly repeats about a detailed location. Since M13mp8 vector does not have the XbaI part, cutting and generation of a fragment are impossible. in this way -- ML-2/M13mp18 - - although a detailed location overly maintains the green fluorescence signal -- ML-4/M13C-2 -- a fluorescence signal is not overly accepted at all in a detailed location.

The limit cutting reaction performed with the restriction enzyme in which the address on a device is possible, and which overly carries out covalent bond to a detailed location is included in the second example. in this case, restriction endonuclease is induction-ized and the address on an APEX device is possible for it -- free field electrophoresis is overly carried out to a detailed location, and covalent bond of them is carried out there -- I will come out. A solid indicator is made to induction-ize a restriction enzyme, and the approach of carrying out covalent bond is learned by this contractor. The address of the restriction enzyme with which versatility differs was able to be carried out to the APEX device. The specific cutting reaction will be performed using free field electrophoresis by [ containing desired restriction endonuclease ] overly condensing ds-DNA vector or a DNA sample in a detailed location. ds-DNA -- cutting -- subsequently -- the others on a device -- a fragment is overly moved to a detailed location. in that case, the address on APEX and a device is possible in a request or other useful DNA modification enzyme -- coupling can overly be carried out to a detailed location. moreover, this example is not limited to DNA modification enzyme, and the address on APEX and a device is possible for it in

the greater part of other enzymes -- it can be made overly to adhere to a detailed location

Example 12: The electronics amplifying method Sensibility could be improved by the duplicate or magnification of a target DNA array by making the purification targets DNA and RNA amplify on APEX and a device directly, when there are very few copy numbers of a target sequence (for example, HIV, septicemia infection, others). Moreover, the need of performing the preparative isolation process of high yield dramatically will also be reduced by magnification before performing hybridization analysis. Perfect electronic control of DNA motion, denaturation, and a synthetic reaction is offered by the APEX magnification protocol. The most important thing is denaturing a DNA hybrid electronically, without using a hot activity, high temperature resistance polymerase, or other heat stable enzymes.

DNA synthesis can be performed without the need for a heat cycle very faithfully, using DNA polymerase (Klenow fragment of the bigger one) as the first example.

In this example, one DNA strand is reproduced by the approach [ having made the detailed location freely overly carry out covalent bond ]. This process makes the prehension probe of a well-known array on a detailed location which is performed by the formula as follows and by which :1 address was carried out overly hybridize a well-known target sequence electronically. 2) The complementary DNA chain (-) which it is going to generate by DNA polymerase mold-ization mold-ized by the prehension probe is compounded. 3) Denature the newly compounded DNA hybrid electronically and annealing of the 4 target DNA is carried out to a \*\*-expanding prehension probe. - Carry out annealing to the - chain DNA which is going to generate the chain complementary probe. 5) Target DNA (+) chain which it is going to generate is compounded by DNA polymerase. The 1 chain DNA is simultaneously compounded like 2, and size selection of the magnification target is made by making the complementary probe which was made to double the number of + and - chains, repeated this process in each time, ranked second to it, and was designed on 6 unique targets by it hybridize. the perfect process shown in drawing 17 is further indicated in a detail below : Adhesion of a target sequence in a process 1 prehension probe the prehension probe which carried out (1) covalent bond of the target sequence is contained -- super- -- a detailed location -- a photoelectron -- it conveys in engineering. Although a target sequence may exist during a \*\*-target (genome) array, before it catches an ANIRINGU \*\*\*\*\* probe, it must be denatured. The target sequences which will be caught first are various die length.

Composition of DNA complementary to process 2 target DNA polymerase and dNTP are overly conveyed to the detailed location 1 in photoelectron engineering. A prehension probe offers DNA polymerase with a three-dash terminal, and a prehension target sequence offers mold. Sufficient current to maintain the concentration of the reagent which is easy to receive effect in composition is passed. A current can be made into constant current or a modulation current. If these indexes are operated, the complementary(-) chain which is going to generate the die length of different range can be obtained. a process 3 -- electronic denaturation of the newly compounded chain The polarity of the detailed location 1 is overly reversed, potential is applied, and 2 chains are made to separate. It will depend on the die length and base composition of hybrid DNA complex for potential and the applied amount of time amount. These indexes can be calculated and determined from experiential or an electronics denaturation curve.

Annealing to the DNA strand of process 4 primer (prehension and complementary probe) Oligo is required to carry out annealing to both + and - DNA strand, and obtain the primer for DNA polymerase. About a target or + chain, this is attained by electronic transport of + chain to a \*\*-expanding prehension probe. By this, it will elongate superfluously and the \*\*-expanding prehension probe of die length about the same as the - chain DNA which carried out covalent bond will be generated. Electrophoresis of the complementary probe is overly carried out to a detailed location, and covalent bond is carried out to the - chain DNA. Shortly, the chain of both + and - is mold DNA polymerase which has the primer combined with them and carries out the catalyst of the composition (refer to drawing).

Although the affinity of a complementary probe can also be generated with the noncovalent bond-chain DNA, these hybrids must not denaturalize electronically and, so, must not hardly have effect in overall magnification.

Composition of new process 52 DNA strand A process 2 is repeated, and when + and - chain start mold formation, the amount of array specific DNA is doubled from from. This geometric increment in the amount of DNA will take place in each time of these repeated processes.

Size selection of a process 6 magnification target sequence The nucleotide sequence of a complementary probe will determine size and array of the magnification target DNA. Therefore, a practice design can be carried out and the effectiveness of secondary analysis and/or actuation can raise Magnification DNA.



other enzymes -- the \*\*\*\* for amplifying methods of this invention -- although things are made and it does not limit to them, combination with other DNA polymerase, T7 or SP6 RNA polymerase, reverse transcriptase, a DNA ligase, polynucleotide phosphorylase, and other nucleic-acid repair enzyme (endonuclease, exonuclease, others) is included.

Example 13: An electronics controller and data system All devices are the properties of the array in which the address of a detailed location (or macro-location) is overly possible in case of any of APEX and a chip, or a micro machine processing device. A computer control/data collecting system is designed so that electronics potential can be independently passed to any pad in an array, and the current which flowed considering the detailed location-electrode system as a result may be measured. computer control / data collection interface: a -- super- -- display of the array of a detailed location In order to solve the cutoff in the highest level by the display of high level and low level, and in order [ in low level ] overly to fully solve cutoff of a detailed location, drawing of a \*\*\*\* detailed location is offered. b) If a detailed location top is overly clicked, control of a detailed location will overly be able to set up by the display of other control array which overly overlaps the thing of a detailed location besides the time amount array of the signal which window drawing of a detailed location overly starts and is the magnitude and the situation of various gestalten and potential when the property of a detailed location is overly explained, and others. Moreover, this system also displays the data and the signal which were overly collected per detailed location by statistics with other data which overly form a detailed location, and comparison. The analysis about a control design, the accepted actual control signal, and collected data, a classification system, and a storage document function are offered by the chart.

c) By software, all switching and data collection are offered through the hardware interface controlled by input from the array control software indicated to b.

d) Image collection and a throughput are offered by separate hardware and a separate software system. this system -- super- -- the array of a detailed location -- projecting -- activity -- the fluorescence signal from the DNA binding interaction in a detailed location is overly recorded, and the result of a DNA binding experiment is read. By image-processing software, these images are processed quantitatively and the capacity that a quantitative assay result can be extracted is offered. It connects with an interface as thoroughly as array control / data-collection software, and this software offers the concentrated system which records all the assay results from the current data and imaging data of APEX device control / electrode, analyzes these data, decreases the result related with assay together with the auxiliary information about the consistency and dependability of these results, and keeps all data and analyses.

e) In an APEX controller, it is [ this software and ] "among assay."

And although the carbon button which accesses the function of a thru/or c will be incorporated with the upper layer which offers only the display of a "result" if it requires, in all cases, a thru/or c will be collected and kept.

f) The controller of an initial version which should be used for the object for development offers the aforementioned hardware interface using the National Instruments (National Instruments) board linked to this Quadra 950, using Macintosh Quadra (Macintosh Quadra) 950 as a host computer. the current of versatility [ boards / these ] -- APEX -- the potential which overly flows an electrode system as a sink and a result in a detailed location is measured. The National Instruments (National Instruments) board used by this controller Yes, a - RESORUSHON multifunction (High Resolution Multifunction) I/O board, NB-MIO-16XL-18, an analog output (Analog Output) board, NB-AO -6, a timing input/output (Timing Input/Output) board, NB-TIO -10, Brock Mohd (Block Mode) DMA-, and -GPIB interface (Interface) board, They are NB-DMA2800, an analog signal conditioning module (Analog Signal Conditioning Modules) board, a module for thermocouples, and other environmental sensor 5b series. The connection between the NuBus board in Quadra and an APEX device is SCXI stored in SCXI-1001 frame. It will let a 16-channel SPDT RIREI module board pass.

Example 14: Preparation of an electronics control sample, and hybridization analysis-concentration APEX system Crushing (for example, digestion) of the selection; cellularity matter, a series of separation processes, and compatibility reaction of a cell are usually included in sample preparation. Sample preparation is important for a molecule biological reaction. For example, since the inefficient more actual amount of target DNA arrays in a sample preparation process is lost so much, hybridization assay is often restricted.

The fundamental APEX concept of electronics control can be used for the sample preparation in DNA-hybridization assay. Probably, the sample preparation, cell selection, and analysis which should be performed on an electronics system [ activity / components / APEX ] by the electronic approach will be

possible. Sample preparation will be started by the cellularity in selection, digestion, and the sample of a cell, and rough separation of DNA from the heterogeneous matter. An electronic device is efficiently moved towards the analysis components of a device, processing this sample DNA electronically and removing other matter. This system offers the suitable scaling factor for Target's DNA efficient processing. Probably, about human genome analysis, the efficient pre-hybridization process that probably a great portion of \*\* -specific DNA will be separated from Target DNA is included in electronic sample preparation.

About sample preparation, a concentration device or a perfect APEX system extracts a rough sample (others [ urine / blood, a sputum, and ]) relatively, processes it by the minimum routine and fluid engineering, and, subsequently carries out the delivery of the target DNA to the analysis components of this device electronically. Generally this "activity electronics processing" differs from the automatic control or robotics processing which is a manual process and a technical mechanical version.

All the concentration APEX and systems for DNA sample preparation and analysis are processible using the components of a large number based on a general APEX concept. a structure-of-a-system element -- (1) electronics cell selector unit; -- (2) electronics reagent dispensing unit; (3) electronics -- unnecessary 1-time activity unit; -- (4) rough DNA selector unit;

(5) The second DNA or a restriction fragment selector unit; (6) DNA-fragment preservation unit; and a (7) APEX analysis unit (chip) are contained. A concentration APEX system is shown in drawing 18 .

This system is processible on a big silicon wafer. As an exception method, each component can be processed with detailed lithography or a micro machine processing technique, and can arrange the platform unit designed specially (for example, it connects). the perfect structure-of-a-system element is designed so that those service areas may be expanded by the fixed ratio to the size of a relative sample, and (a cell -- like) the amount of the matter in this sample (cutback). for example, generally a cell sorter service area is larger than a rough DNA selector service area -- will come out and I will be -- it carries out and then it is larger than a restriction fragment APEX analysis chip service area -- will come out and I will be -- it carries out and larger than an APEX chip service area -- I will come out.

although this cell sorter "effective area" can be considered as the order of 2 several cm as an example -- 64 -- the sum total "effective area" about a detailed location APEX analysis component will overly be less than [ 1mm ] two. The platform unit is designed so that all the component units in a sealing common buffer-solution reservoir may be supported. The suitable sample which reaches hundreds of microl is added to this system through sample addition opening near a cel selector component. A cel selector component is the APEX device of the big scale which can have the selection compatibility exceeding per [ different / 1 ] cell type or different it. Selection of such compatibility can be performed based on cell surface charge, hapten, and an antigen.

As an example, compatibility selection of a whole blood liquid sample can choose a leucocyte cell (a lymphocyte, others) from an erythroid cell. An embryonal cell can be chosen from a corporal blood sample using a high selection process. Moreover, compatibility selection can also be made about an infectivity microorganism (a general invitation, mold, recently, and virus). the selected cell carries out cel selector component adhesion, and remains -- receiving --; -- all -- others -- a cell and the protein matter are conveyed to an one consumption activity unit. At this event, a cell is digestible with the free field electrophoresis transport from the electronics reagent dispensing unit of the cleaning agent which carried out electrification, the chaotropic agent and/or a suitable digestive enzyme, and a proteolytic enzyme (a lysozyme, protein kinase K, a pepsin, others) to the cell on a cel selector unit. By deflecting an one electronics consumption activity system suitably, a certain kind of digestive consumption matter is removable. By just deflecting a rough DNA selector unit, even this component can convey the rough nucleic-acid (DNA/RNA) matter shortly.

A rough DNA selector is an APEX device which has general compatibility to DNA. This compatibility is a front face containing the front face which just carried out electrification, community, or a repetitious DNA array. For example, the Alu repeat prehension array will catch efficiently rough DNA of most which was extracted from the human cell. When infectious disease analysis is an object, bacteria common to community or a group or a virus array can be used. In addition to removing a foreign material from DNA,; this APEX and system are designed also so that the compound nature of Sample DNA may be decreased. This can be attained by cutting DNA selectively in a rough DNA selector unit using a restriction enzyme. This restriction enzyme is conveyed from a reagent dispensing unit.

A cutting restriction fragment is conveyed from the second DNA or a restriction fragment selector unit by just deflecting it shortly. Using the suitable prehension array on that front face, this unit is designed

so that it may combine with DNA of a big fragment selectively.

The DNA fragment chosen at this event is conveyed even to an APEX analysis chip for hybridization analysis. Moreover, a DNA fragment can be conveyed even to the exterior of a storage unit or a system. The aforementioned example shows some of mere possible scenarios to sample preparation and two or more hybridization analysis. The binding affinity of a component can perform extensive various processes by the programmable thing, united different component, and the versatility of a function. Although DNA was used as the first example, an aforementioned device and an aforementioned approach can be used also for processing and analysis of a target RNA molecule, protein, a polysaccharide, a lipid, and other macromolecules.

All the periodicals including the nucleic-acid array and amino acid sequence which are carried by each periodical referred to carry out source designation, and it is considered that they are some of these descriptions.

Other examples are within the limits of the following claims.



## 配 列 表

## (1)一般情報：

(i)出願人：           マイケル・ジェイ・ヘラー(Michael J. Heller)  
                          ユージン・チュー(Eugene Tu)  
                          グレン・エイ・エバンス(Glen A. Evans)  
                          ロナルド・ジイ・ソスノウスキー(Ronald G. Sosnoeski)

(ii)発明の名称：分子生物学的分析および診断用の自己アドレス指定可能な  
超小型電子システムおよびデバイス

(iii)配列の数：45

## (iv)通信住所：

(A)受信人：           ライオン・アンド・ライオン(Lyon & Lyon)  
(B)通り：           ウエスト・シックス・ストリート611番  
(C)都市：           ロスアンゼルス  
(D)州：           カリフォルニア州  
(E)国籍：           合衆国  
(F)郵便番号：       90017

## (v)コンピューター判読形式：

(A)媒体の型：       3.5' ディスケット、1.44Mb保存  
(B)コンピューター：   IBMコンパチブル  
(C)オペレーティング・システム：   IBM P.C.DOS(バージョン5.0)  
(D)ソフトウェア：   ワードパーフェクト(バージョン5.1)

## (vi)最新出願データ：

(A)出願番号：       08/271,882  
(B)出願日：       1994年7月7日  
(C)分類：

## (vii)先の出願データ：

(A)出願番号： 0 8 / 1 4 6 , 5 0 4

(B)出願日： 1 9 9 3 年 1 1 月 1 日

(v i i i) 代理人/代理事務所情報：

(A)氏名： マーフィー, デイビッド・バイ  
(Murphy, David B.)

(B)登録番号： 3 1 , 1 2 5

(C)参照/ファイル番号 2 0 7 / 2 6 3

(i x) 電信電話通信情報：

(A)電話番号： (2 1 3) 4 8 9 - 1 6 0 0

(B)ファックス番号： (2 1 3) 9 5 5 - 0 4 4 0

(C)テレックス番号： 6 7 - 3 5 1 0

(2) 配列番号： 1 に関する情報：

(i) 配列の特性：

(A)配列の長さ： 2 4

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i) 配列： 配列番号： 1：

GCT ACG CCC TGC TCA TGA GTC TCU

24

(2) 配列番号： 2 に関する情報：

(i) 配列の特性：

(A)配列の長さ： 2 1

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i) 配列： 配列番号： 2：

AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAU

21

## (2)配列番号：3に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	3 4
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (i i)配列：配列番号：3：

CTA CGT GGA CCT GGA GAG GAA GGA GAC TGC CTG U 34

## (2)配列番号：4に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	2 0
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (i i)配列：配列番号：4：

GAG TTC AGC AAA TTT GGA GU 20

## (2)配列番号：5に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	2 0
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (i i)配列：配列番号：5：

CGT AGA ACT CCT CAT CTC CU 20

## (2)配列番号：6に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	1 8
(B)配列の型：	核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：6：

GTC TCC TTC CTC TCC AGU

18

(2)配列番号：7に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 20

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：7：

GAT GAG CAG TTC TAC GTG GU

20

(2)配列番号：8に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 18

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：8：

CTG GAG AAG AAG GAG ACU

18

(2)配列番号：9に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 22

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：9：

TTC CAC AGA CTT AGA TTT GAC U

22

## (2)配列番号：10に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	20
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (ii)配列：配列番号：10：

TTC CGC AGA TTT AGA AGA TU	20
----------------------------	----

## (2)配列番号：11に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	20
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (ii)配列：配列番号：11：

TGT TTG CCT GTT CTC AGA CU	20
----------------------------	----

## (2)配列番号：12に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	20
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (ii)配列：配列番号：12：

CAG CGC TGT GAC AAA ACA TU	20
----------------------------	----

## (2)配列番号：13に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	20
(B)配列の型：	核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：13：

TGC GAG CTG CAG TCA GAC AT

20

(2)配列番号：14に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 18

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：14：

GAG AGA CTC ATG AGC AGG

18

(2)配列番号：15に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 18

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：15：

CCT CGT CAT GAG TCT CTC

18

(2)配列番号：16に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 19

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：16：

TTT TTT TTT TTT TTT TTT T

19

## (2)配列番号：17に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	33
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (i i)配列：配列番号：17：

CAG GCA GTC TCC TTC CTC TCC AGG TCC ACG TAG 33

## (2)配列番号：18に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	19
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (i i)配列：配列番号：18：

CTC CAA ATT TGC TGA ACT C 19

## (2)配列番号：20に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	19
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (i i)配列：配列番号：20：

GGA GAT GAG GAG TTC TAC G 19

## (2)配列番号：21に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	17
(B)配列の型：	核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：2 1：

CTG GAG AGG AAG GAG AC

17

(2)配列番号：2 2に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 1 9

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：2 2：

CCA CGT AGA ACT GCT CAT C

19

(2)配列番号：2 3に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 1 7

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：2 3：

GTC TCC TTC TTC TCC AG

17

(2)配列番号：2 4に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 2 1

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：2 4：

GTC AAA TCT AAG TCT GTG GAA

21



## (2)配列番号：25に関する情報：

## (i)配列の特性：

- (A)配列の長さ： 19  
(B)配列の型： 核酸  
(C)鎖の数： 一本鎖  
(D)トポロジー 直鎖状

## (i i)配列：配列番号：25：

ATC TTC TAA ATC TGC GGA A

19

## (2)配列番号：26に関する情報：

## (i)配列の特性：

- (A)配列の長さ： 19  
(B)配列の型： 核酸  
(C)鎖の数： 一本鎖  
(D)トポロジー 直鎖状

## (i i)配列：配列番号：26：

GTC TGA GAA CAG GCA AAC A

19

## (2)配列番号：27に関する情報：

## (i)配列の特性：

- (A)配列の長さ： 19  
(B)配列の型： 核酸  
(C)鎖の数： 一本鎖  
(D)トポロジー 直鎖状

## (i i)配列：配列番号：27：

ATG TTT TGT CAC AGC GAT G

19

## (2)配列番号：28に関する情報：

## (i)配列の特性：

- (A)配列の長さ： 30  
(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：28：

GGT GGT GGG CGC CGG CGG TGT GGG CAA GAU 30

(2)配列番号：29に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 30

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：29：

GGT GGT GGG CGC CGT CGG TGT GGG CAA GAU 30

(2)配列番号：30に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 15

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：30：

CC GCG GCC GCC ACA C 15

(2)配列番号：31に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 15

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：31：

CC GCG GCA GCC ACA C 15

## (2)配列番号：3 2に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	1 5
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (i i)配列：配列番号：3 2：

CC TGT GCA GCC ACA C 15

## (2)配列番号：3 3に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	3 0
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (i i)配列：配列番号：3 3：

GGT GGT GGG CGC CGG CGG TGT GGG CAA GAU 30

## (2)配列番号：3 4に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	2 9
(B)配列の型：	核酸
(C)鎖の数：	一本鎖
(D)トポロジー	直鎖状

## (i i)配列：配列番号：3 4：

GGT GGT GGG CGC CGG CGG TGT GGG CAA GA 29

## (2)配列番号：3 5に関する情報：

## (i)配列の特性：

(A)配列の長さ：	2 2
(B)配列の型：	核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：35：

TGC CCA CAC CGC CGG CGC CCA C 22

(2)配列番号：36に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 22

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：36：

TGC CCA CAC CGA CGG CGC CCA C 22

(2)配列番号：37に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： ?

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：37：

TGC CCA CAC CAC CGA CGG TGC CCA C 22

(2)配列番号：38に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 7

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：38：

ACA CCG C 7

## (2)配列番号：39に関する情報：

## (i)配列の特性：

- (A)配列の長さ：7
- (B)配列の型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー直鎖状

## (ii)配列：配列番号：39：

ACA ACG C

7

## (2)配列番号：40に関する情報：

## (i)配列の特性：

- (A)配列の長さ：31
- (B)配列の型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー直鎖状

## (ii)配列：配列番号：40：

CCA GTC ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG U

31

## (2)配列番号：41に関する情報：

## (i)配列の特性：

- (A)配列の長さ：31
- (B)配列の型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー直鎖状

## (ii)配列：配列番号：41：

GTA ATC ATG GTC ATA CGT GTT TCC TGT GTG U

31

## (2)配列番号：42に関する情報：

## (i)配列の特性：

- (A)配列の長さ：40
- (B)配列の型：核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：4 2：

GCA TGC CTG CAG GTC GAC TCT AGA GGA TCC CCG GGT ACC G 40

(2)配列番号：4 3に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 4 0

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：4 3：

TGC CAA GCT TGG CTG CAG GTC GAC GGA TCC CCT GGA ATT C 40

(2)配列番号：4 4に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 2 4

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：4 4：

AAA TTG TTA TCC GCT CAC AAT TGC 24

(2)配列番号：4 5に関する情報：

(i)配列の特性：

(A)配列の長さ： 2 4

(B)配列の型： 核酸

(C)鎖の数： 一本鎖

(D)トポロジー 直鎖状

(i i)配列：配列番号：4 5：

ACA CAA CAT ACG AGC AGC CGG AAG CAT 24

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any  
damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

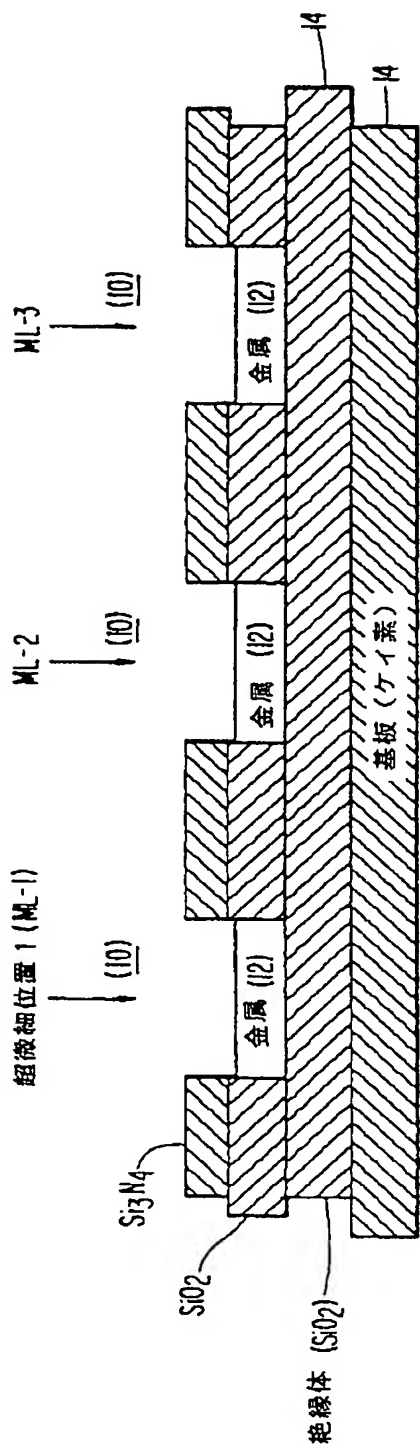
---

DRAWINGS

---

[Drawing 1]

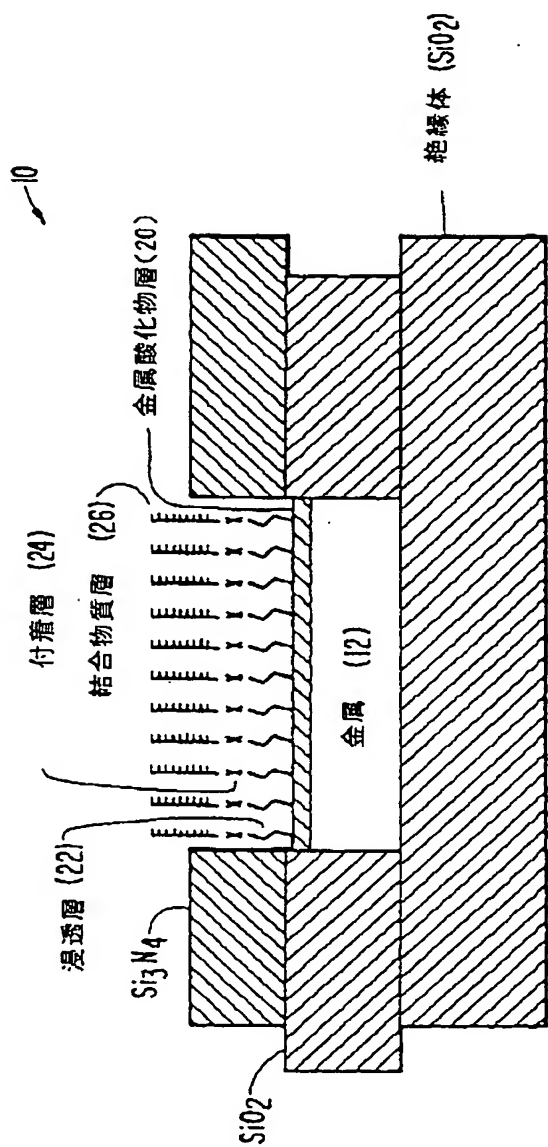
FIG. 1.



[Drawing 2]

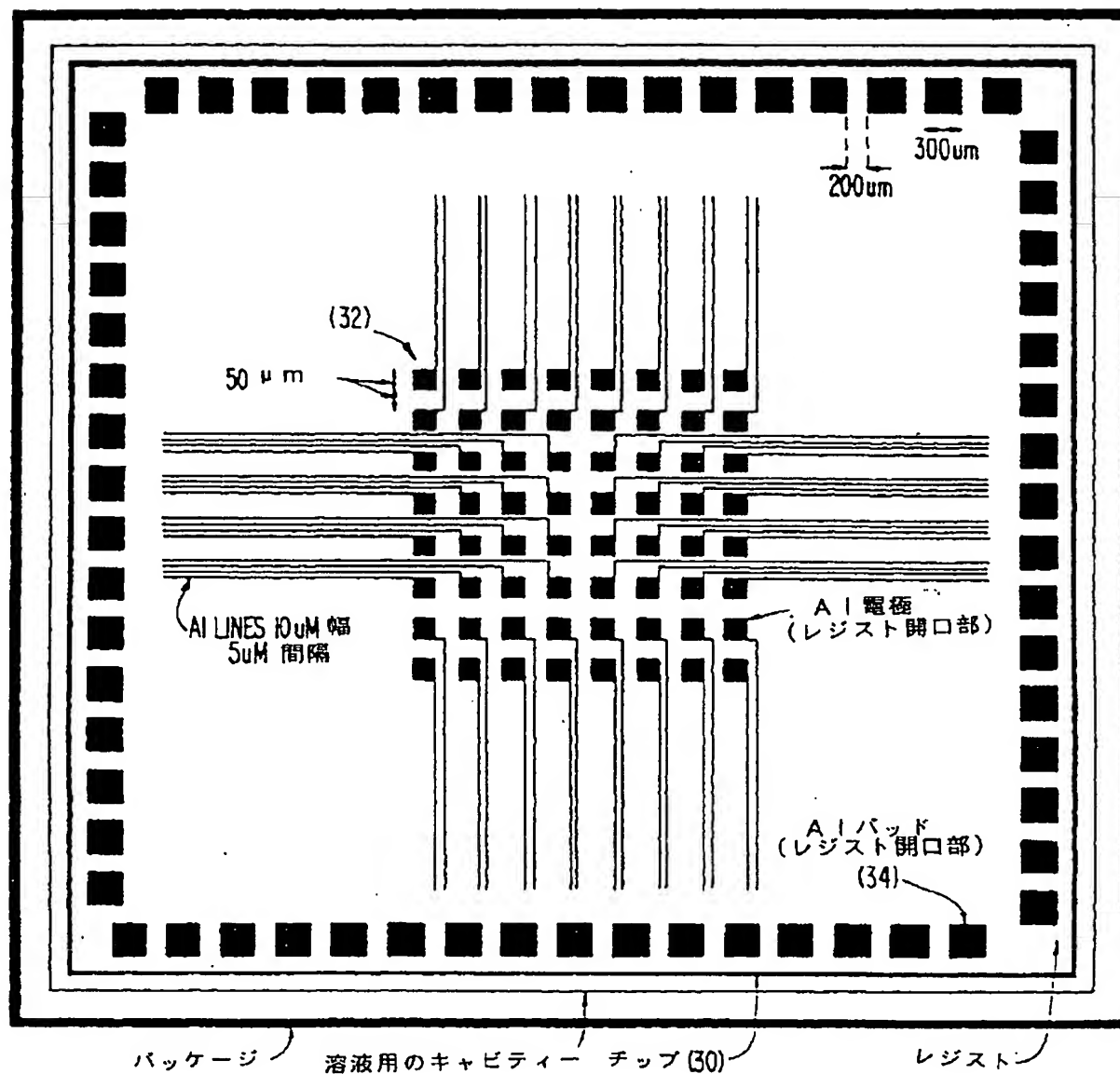


FIG. 2.

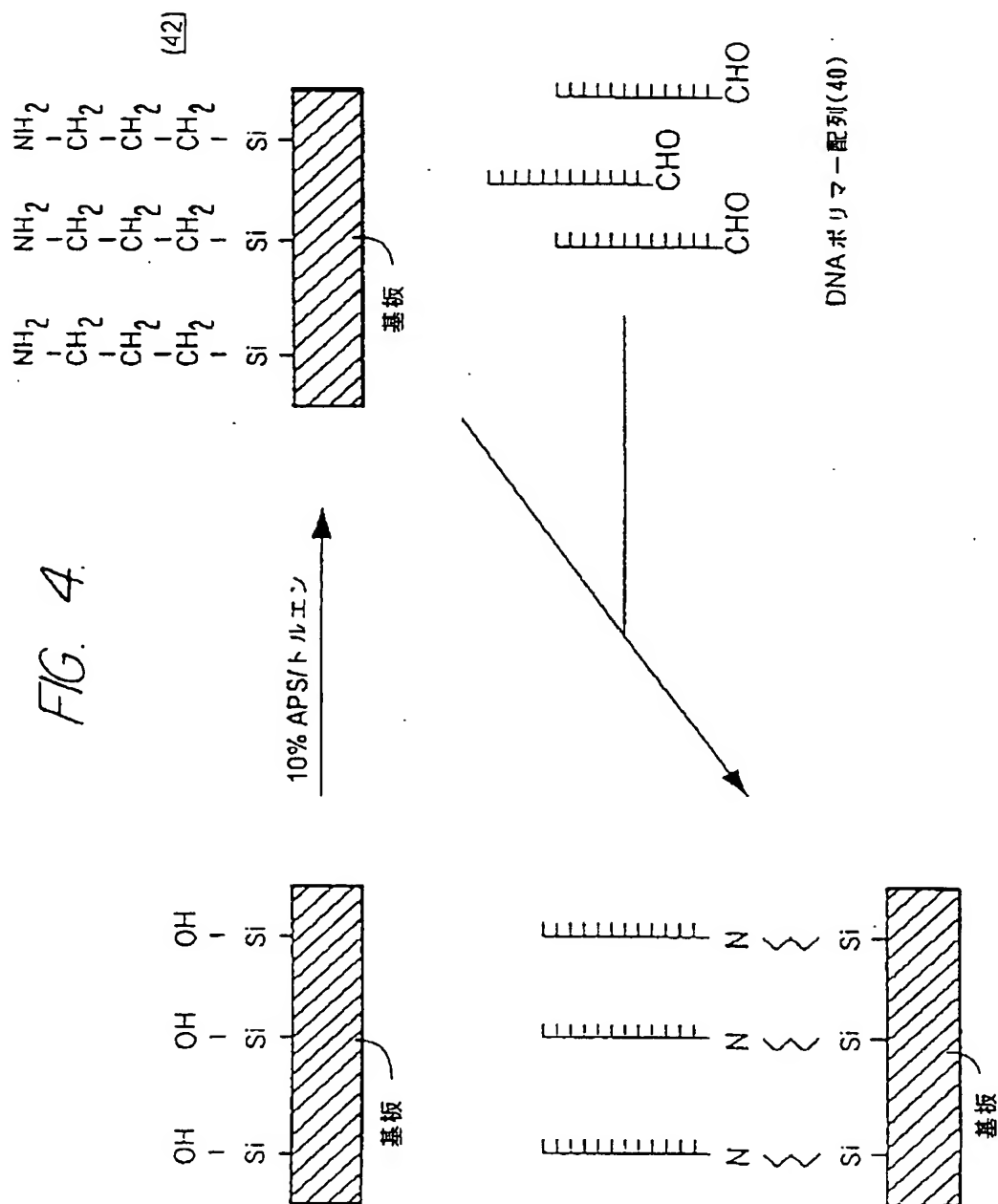


[Drawing 3]

FIG. 3.

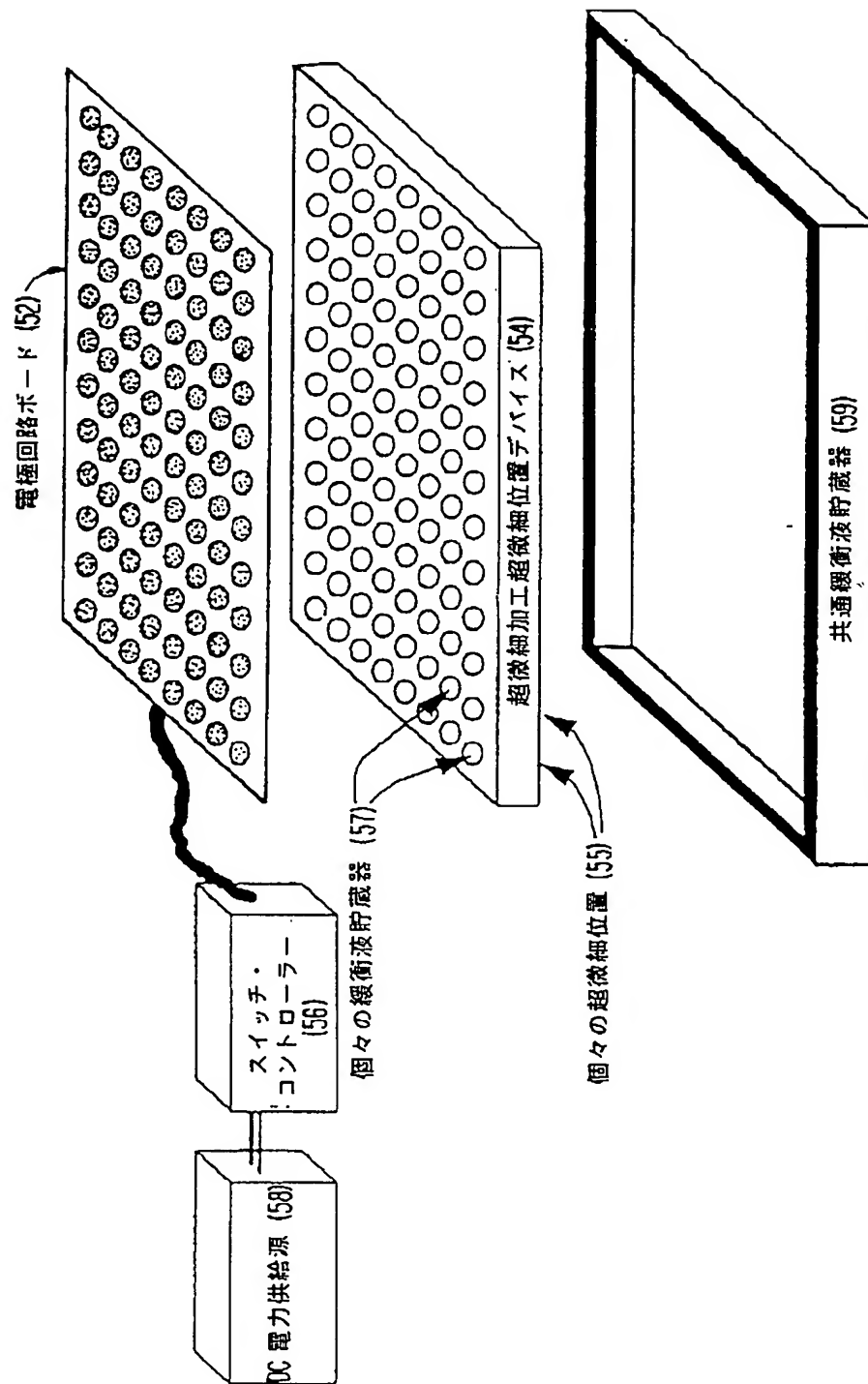


[Drawing 4]



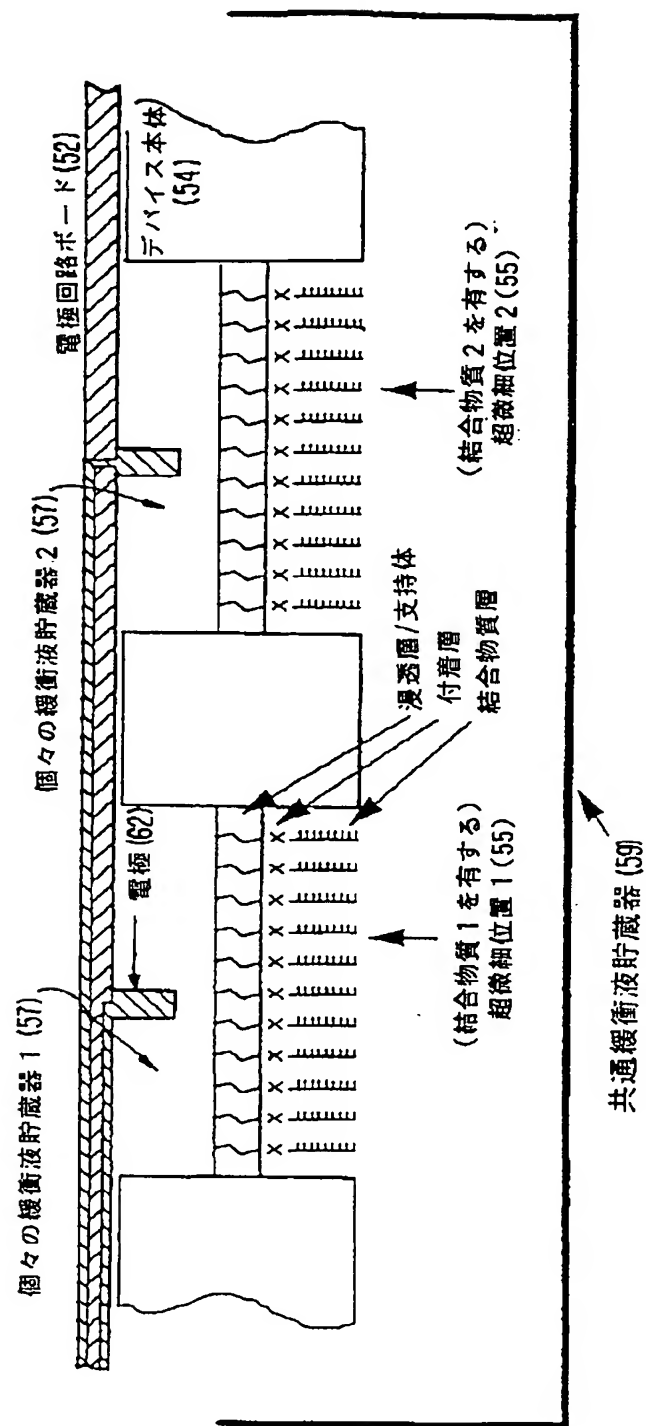
[Drawing 5]

FIG. 5.



[Drawing 6]

FIG. 6.



[Drawing 7]

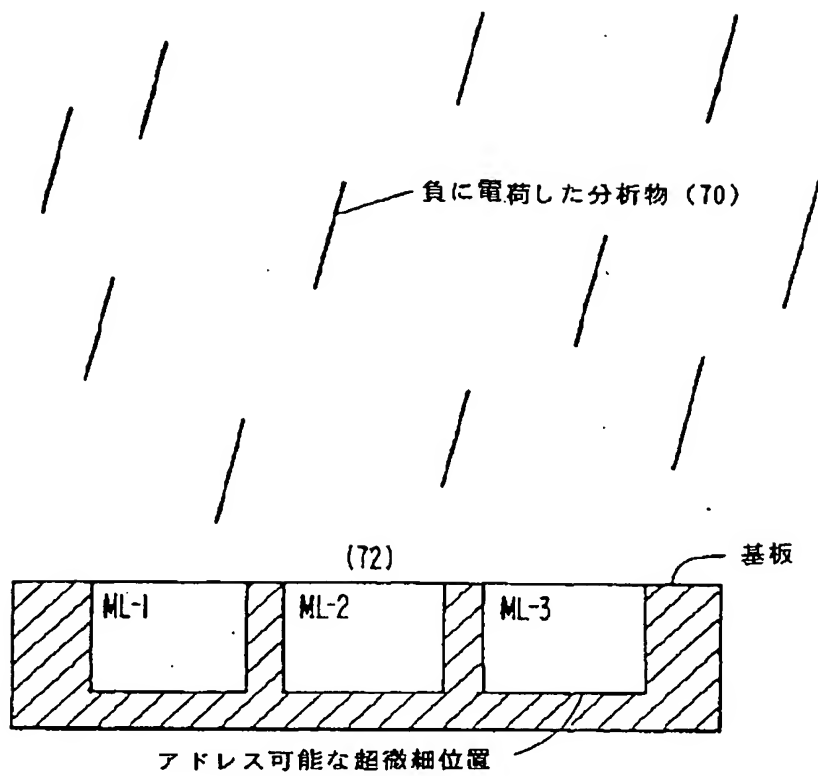


FIG. 7a.

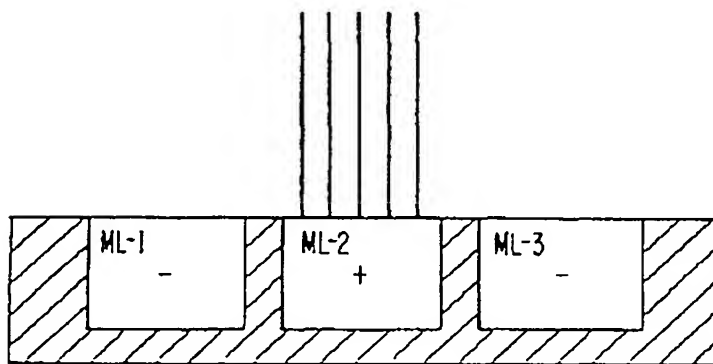


FIG. 7b.

[Drawing 8]

FIG. 8a.

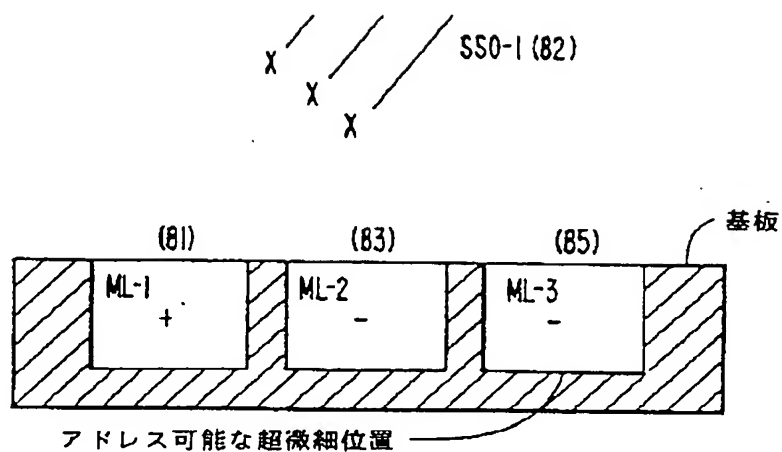


FIG. 8b.

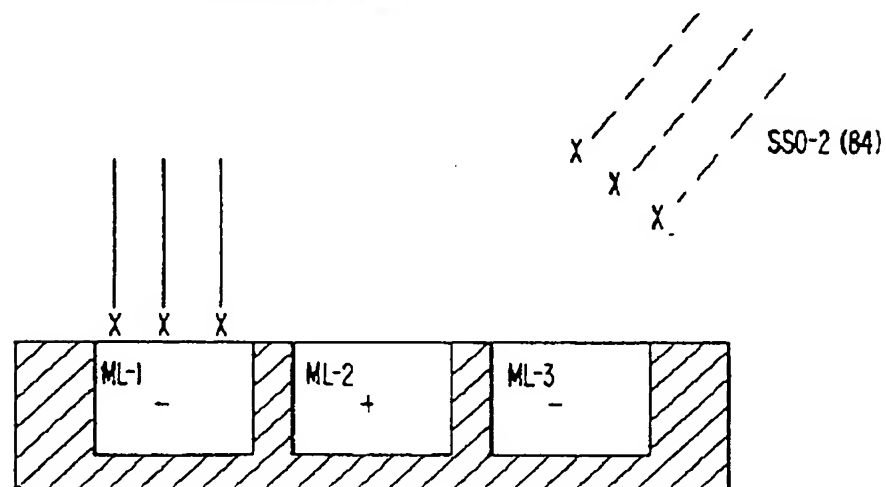


FIG. 8c.

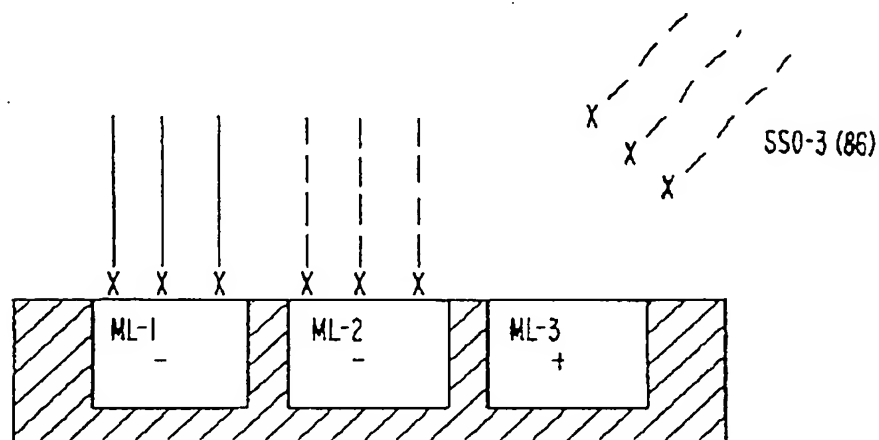
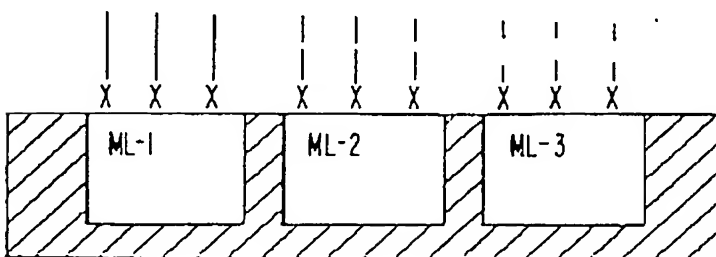
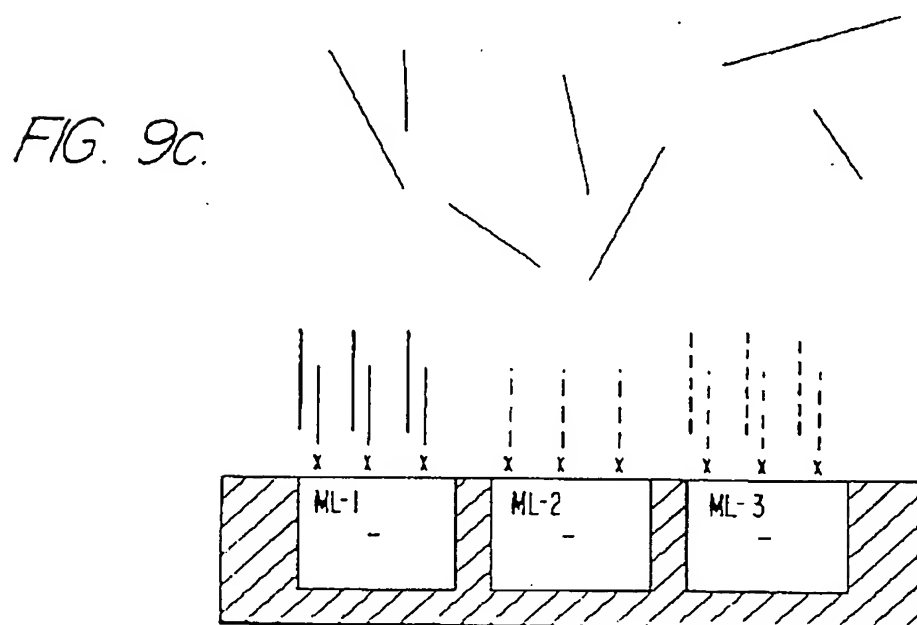
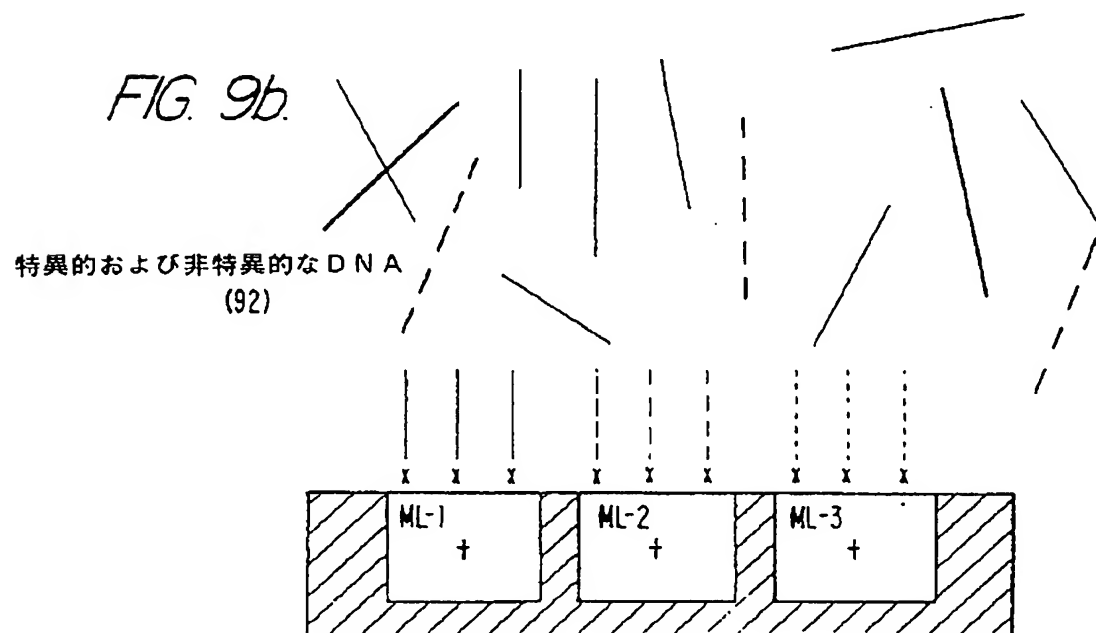
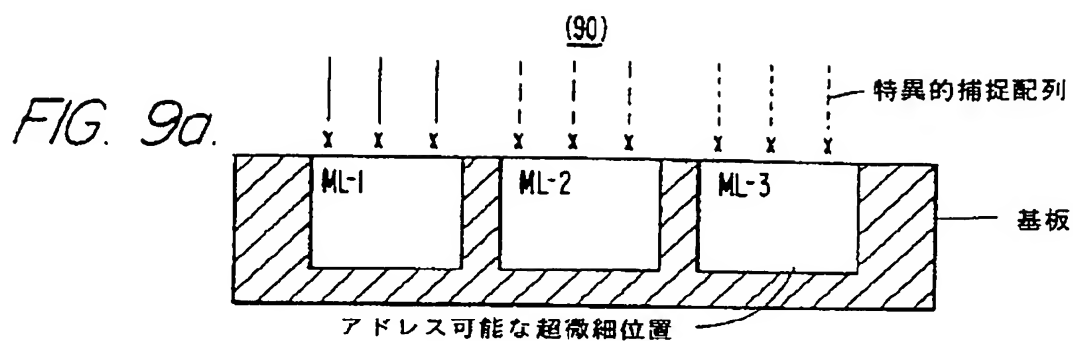


FIG. 8d.

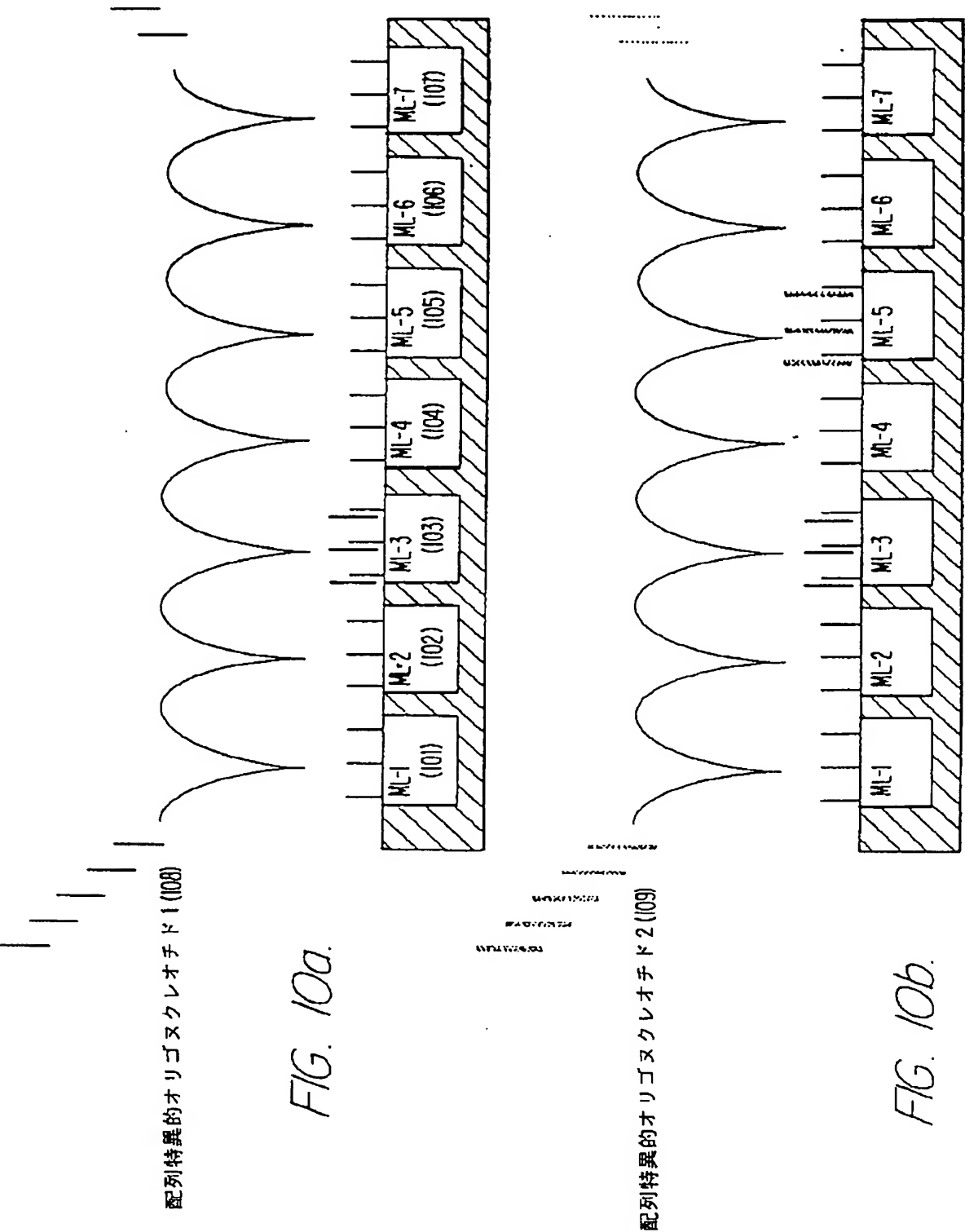


[Drawing 9]



[Drawing 10]





[Drawing 11]

FIG. 11a.

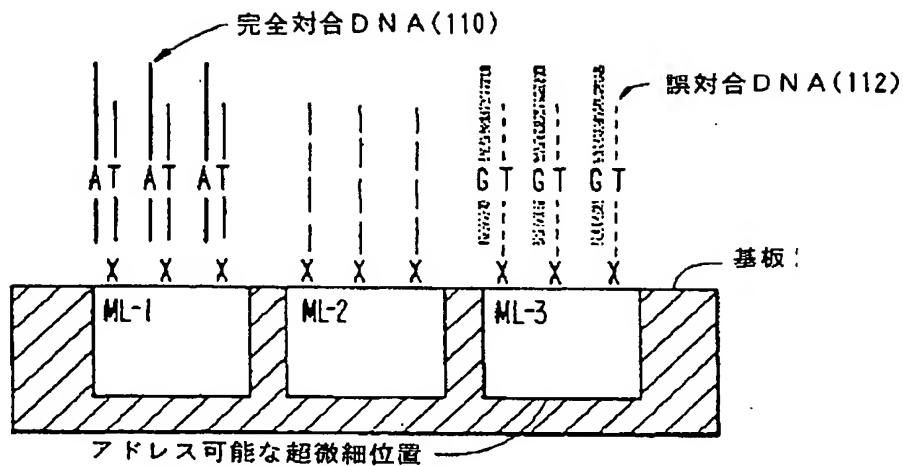


FIG. 11b.

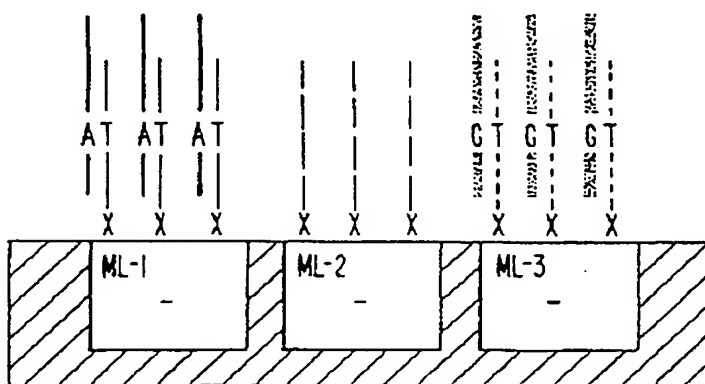
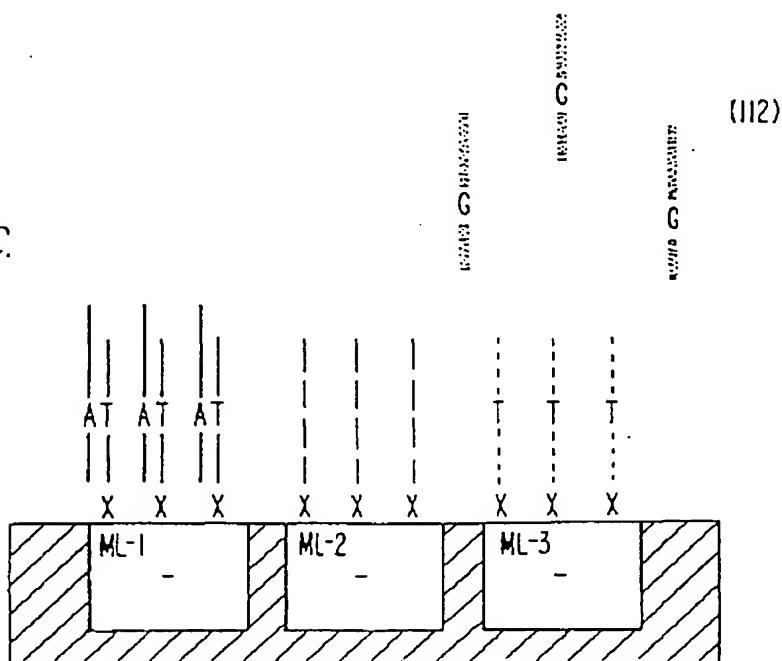


FIG. 11c.



[Drawing 12]

FIG. 12a.

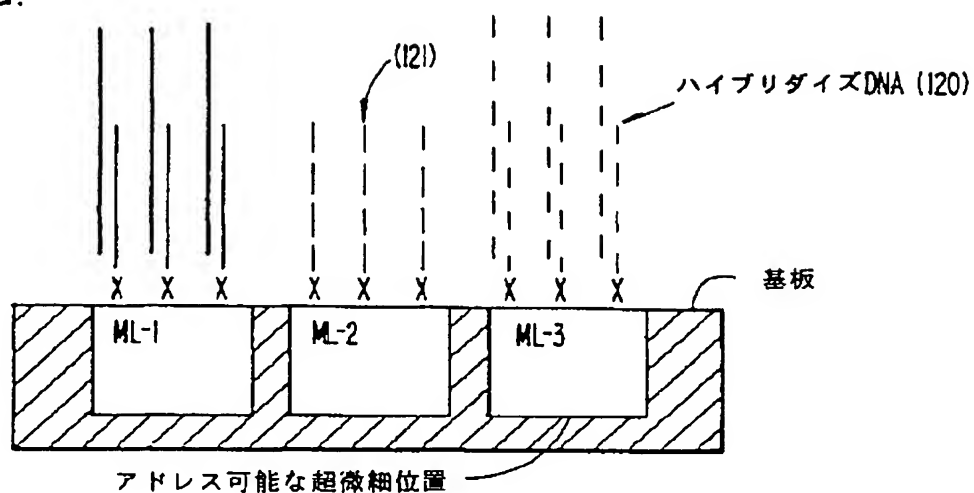
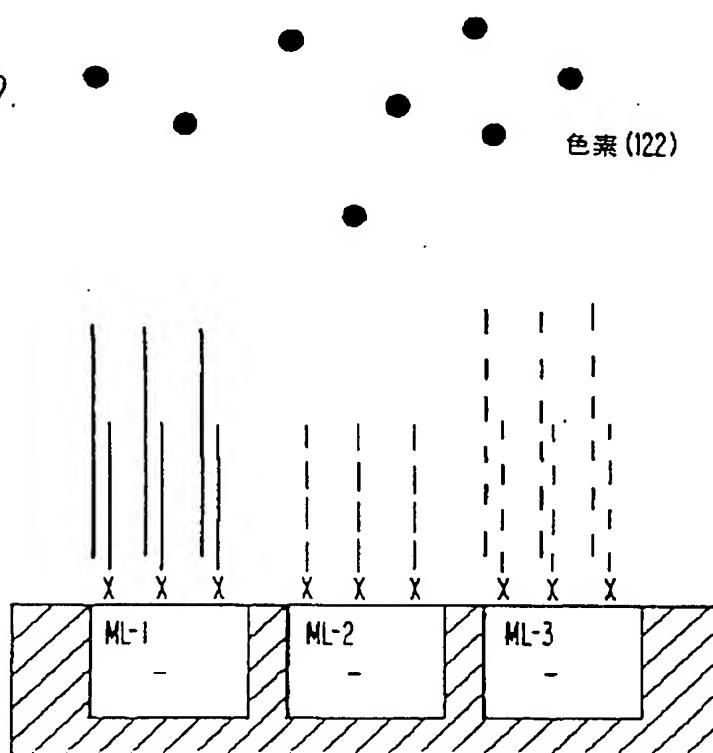


FIG. 12b.



[Drawing 12]

FIG. 12c.

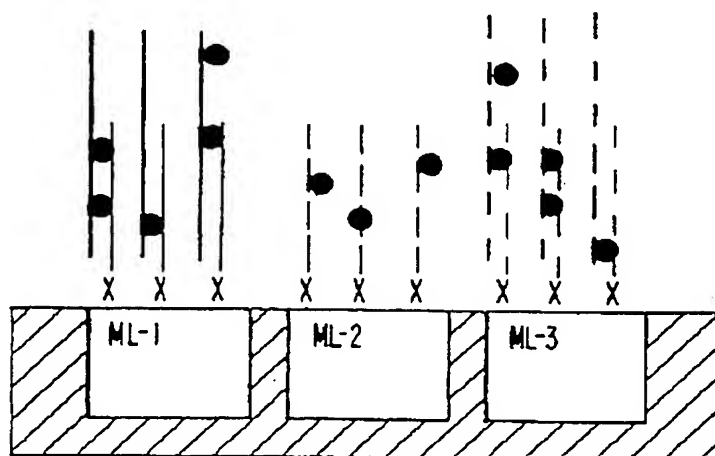
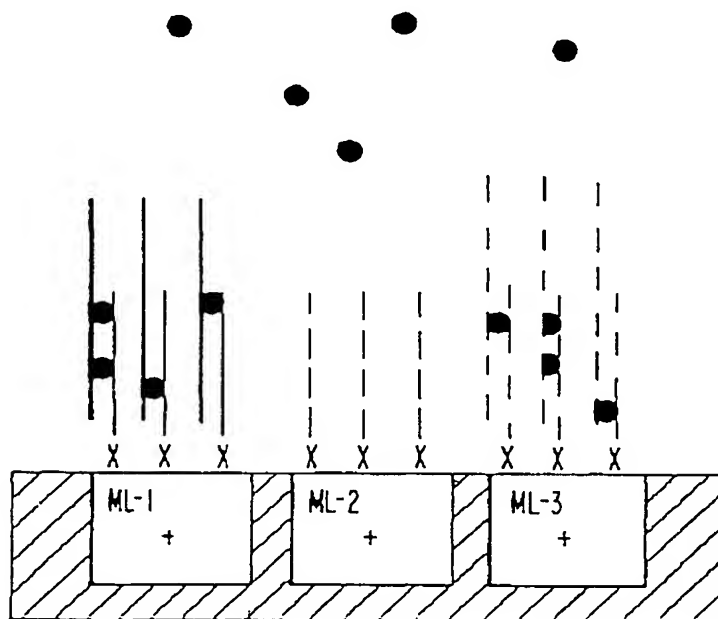


FIG. 12d.



[Drawing 13]

FIG. 13a.

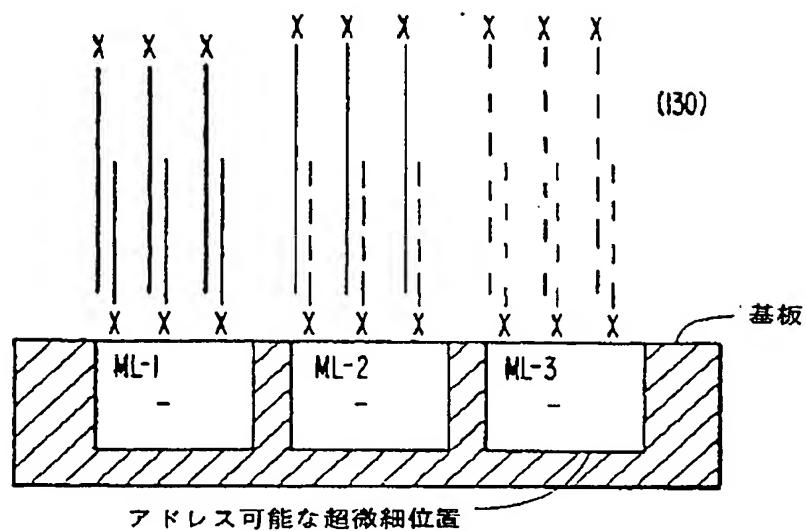
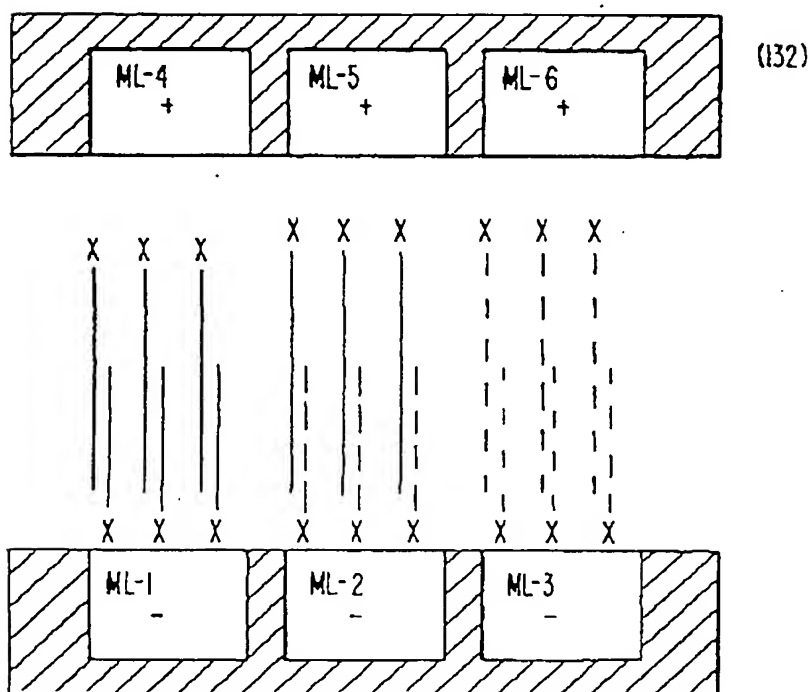
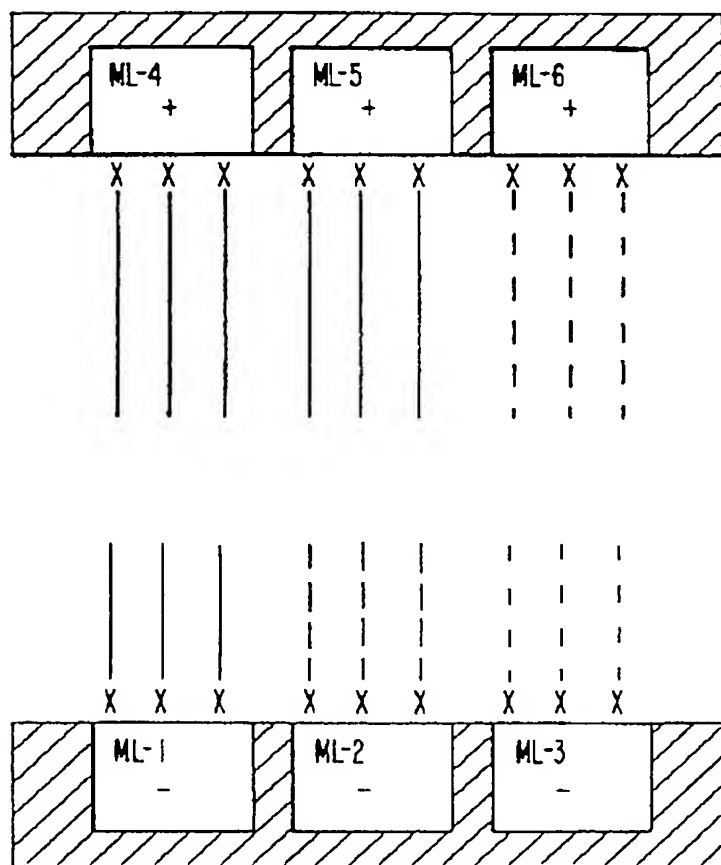


FIG. 13b.



[Drawing 13]

FIG. 13c.



[Drawing 14]

FIG. 14a.

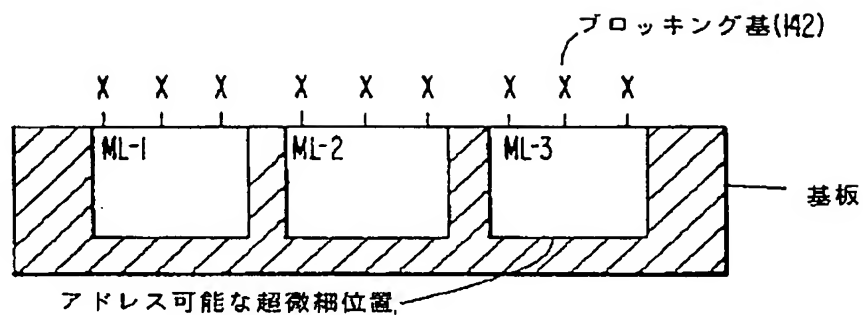


FIG. 14b.

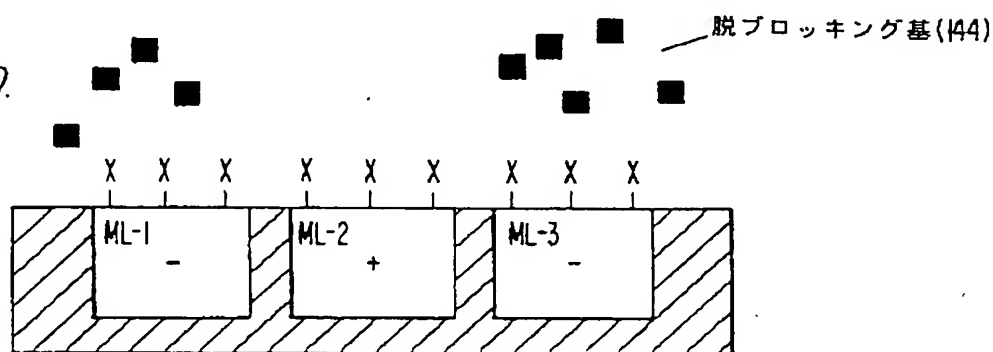
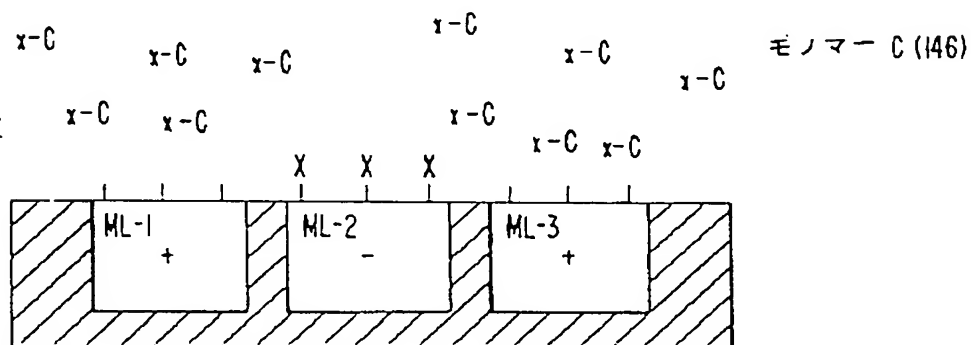


FIG. 14c.



[Drawing 14]

FIG. 14d.

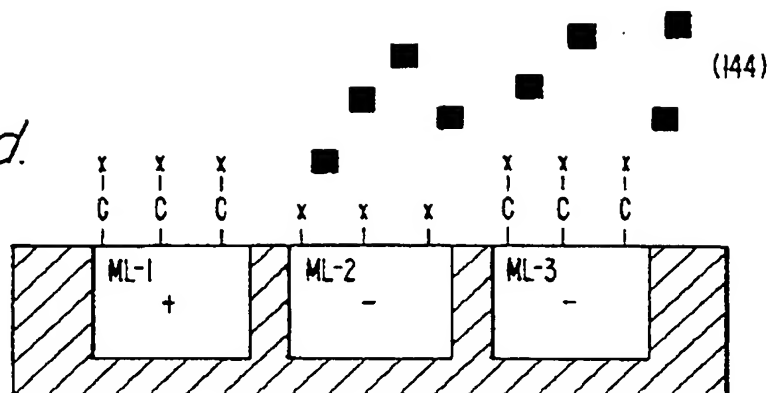


FIG. 14e.

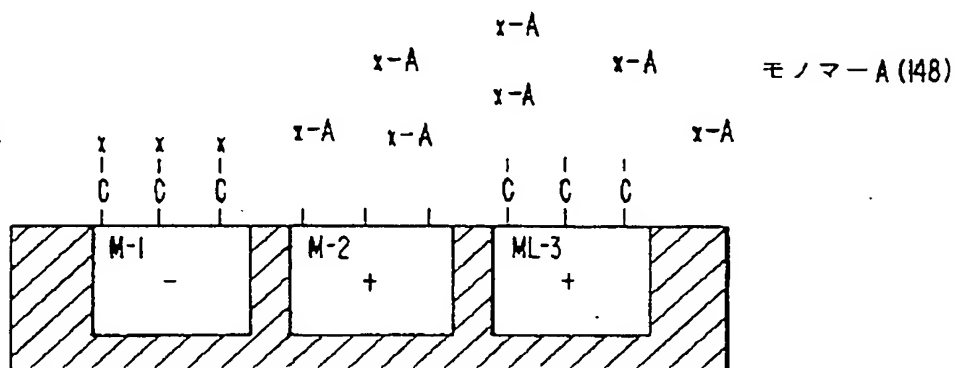
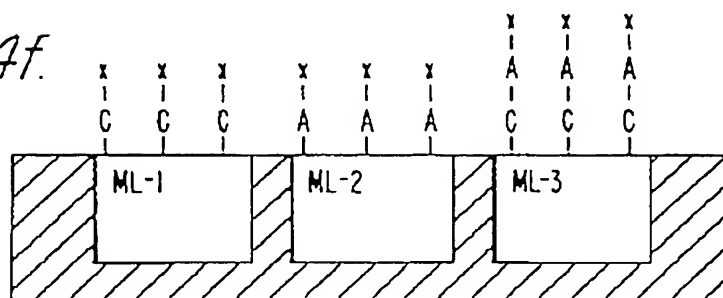


FIG. 14f.



[Drawing 15]



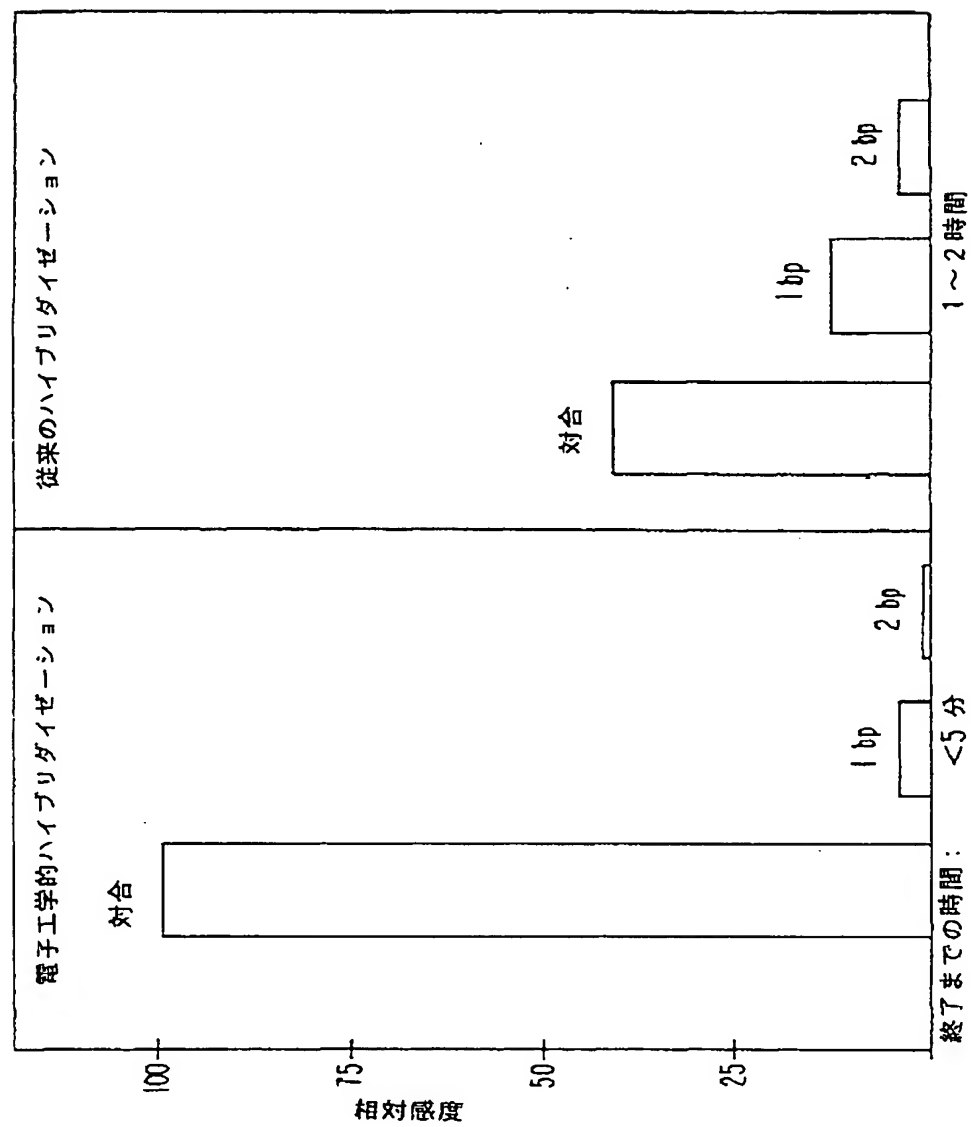
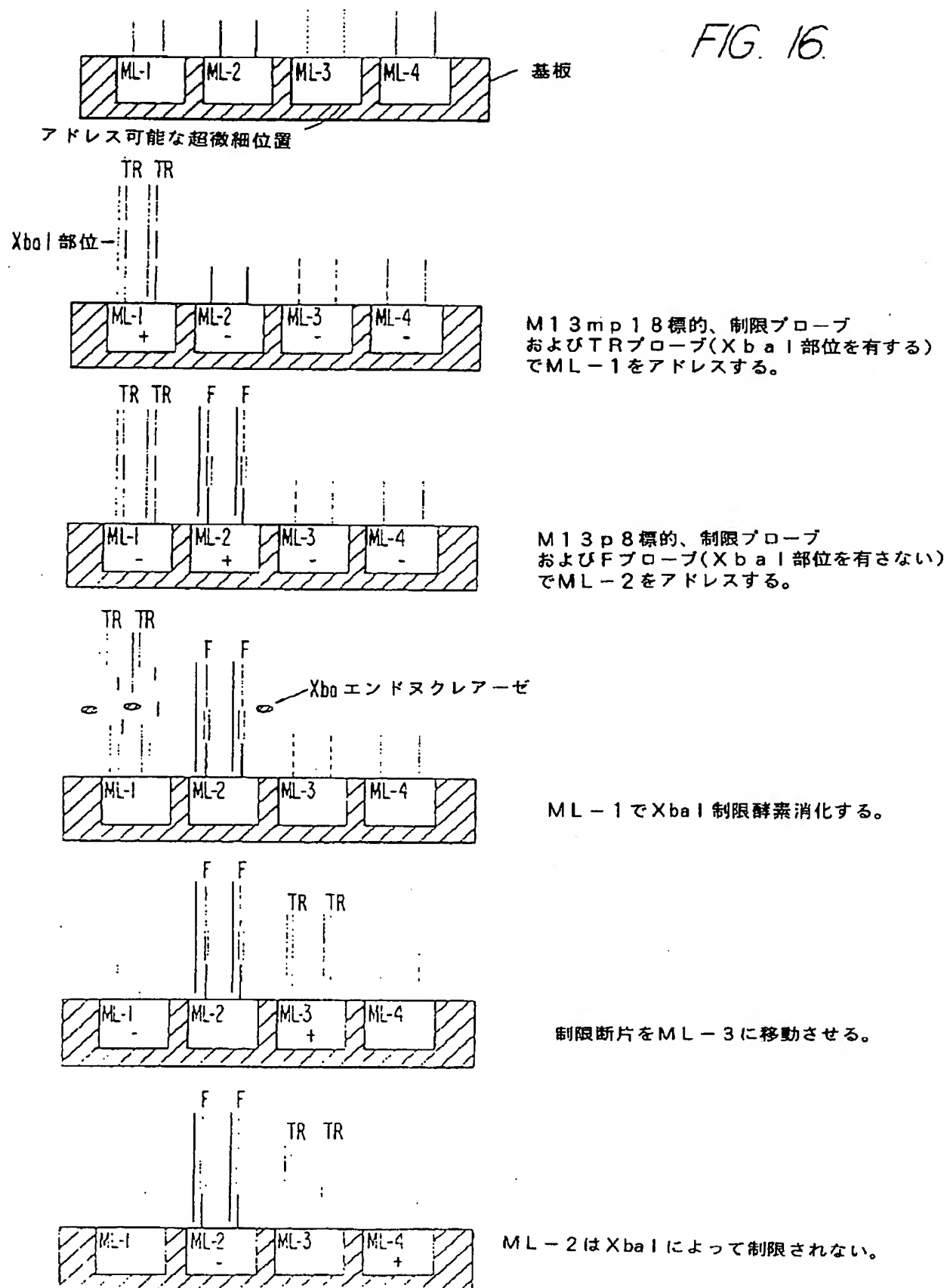
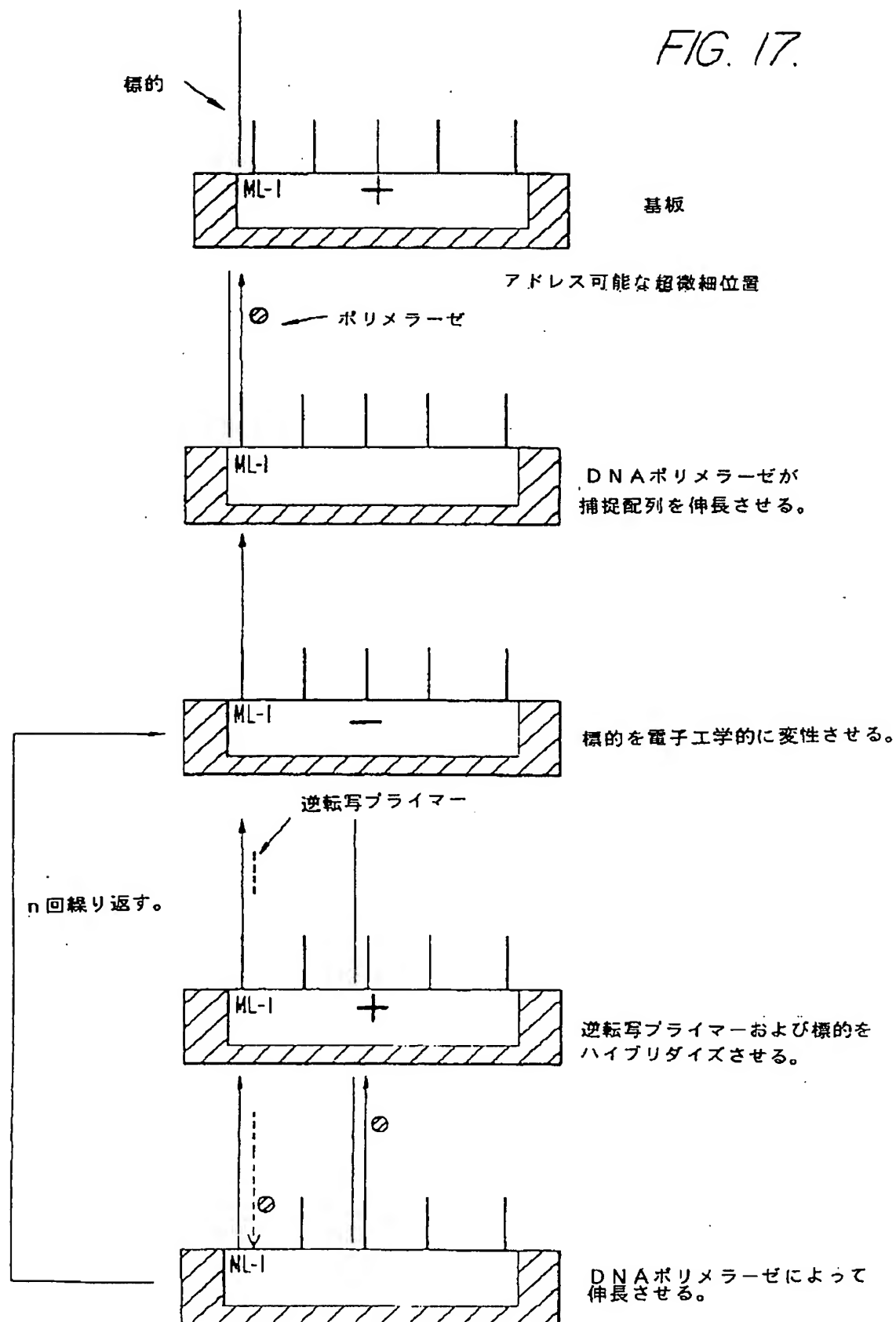


FIG. 16.



[Drawing 17]

FIG. 17.



[Drawing 18]

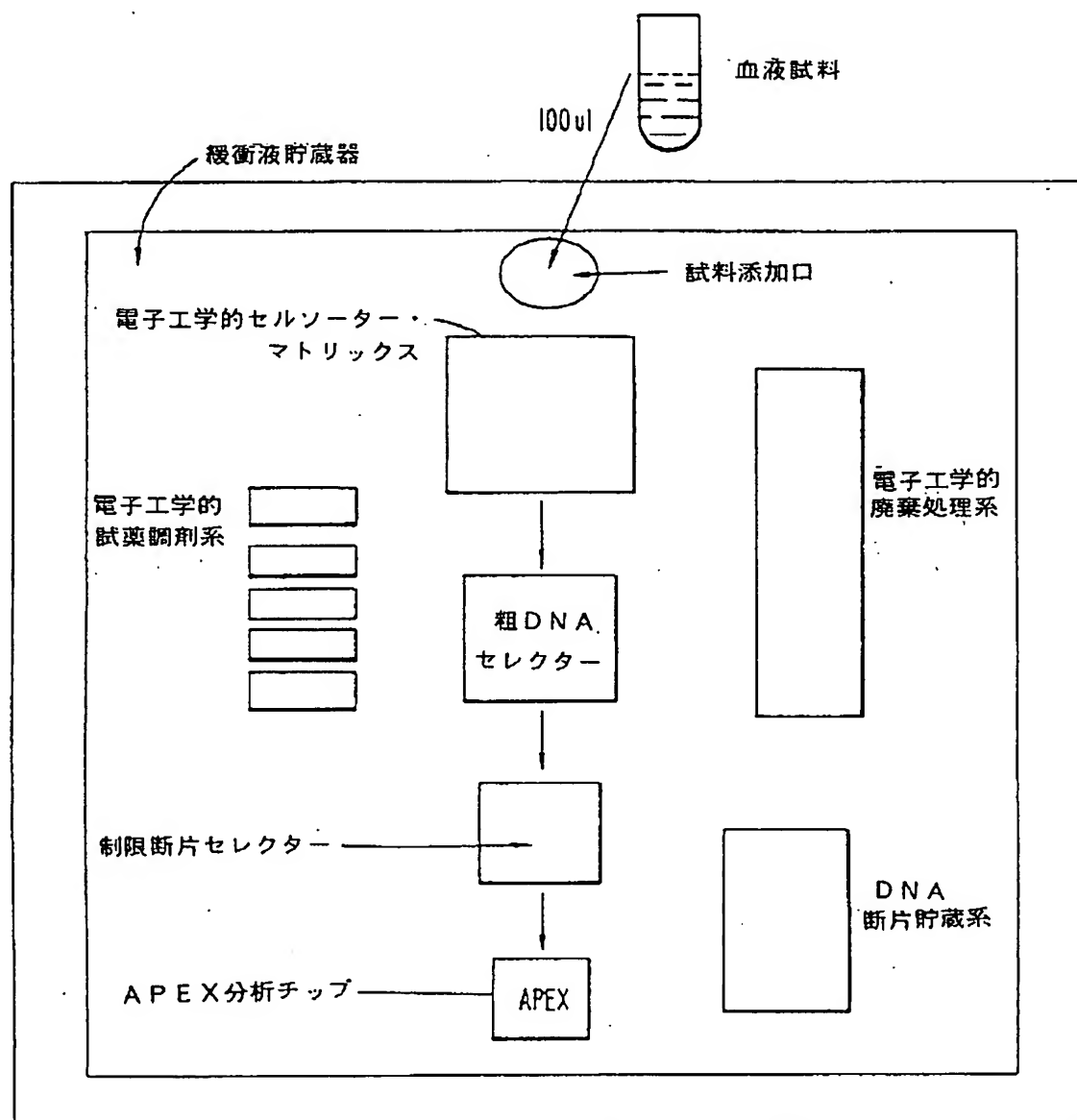


FIG. 18.

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.

3. In the drawings, any words are not translated.

---

CORRECTION OR AMENDMENT

---

[Kind of official gazette] Printing of amendment by the 1st term of Article 17 of Patent Law, and the convention of 2 of Article 17 of Patent Law

[Category partition] The 1st partition of the 6th category

[Publication date] November 19, Heisei 14 (2002. 11.19)

[Announcement number] Patent Publication Heisei 9-503307

[Announcement day] March 31, Heisei 9 (1997. 3.31)

[Annual volume number]

[Application number] Japanese Patent Application No. 8-504426

[The 7th edition of International Patent Classification]

G01N 27/327

C12Q 1/68

G01N 27/27

27/333

33/50

33/566

// C12N 15/09 ZNA

[FI]

G01N 27/30 351

C12Q 1/68 A

G01N 33/50 P

33/566

27/30 357

331 Y

27/46 A

C12N 15/00 ZNA A

# 手続補正書

平成 14 年 6 月 11 日

特許庁長官殿

## 1. 事件の表示

平成 08 年特許願第 504426 号

## 2. 補正をする者

名称 ナノゲン、インコーポレイテッド

## 3. 代理人

住所 〒540-0001  
大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 1 M P ビル  
青山特許事務所  
電話 (06) 6949-1261  
FAX (06) 6949-0361

氏名 弁理士 (6214) 青山 栄



## 4. 補正対象書類名

請求の範囲

## 5. 補正対象項目名

請求の範囲

## 6. 補正の内容

別紙の通り

(別紙)

# 請求の範囲

1. 各々が電極を含む複数の電子工学的にアドレス可能な位置；および該複数の位置の各々に付着した結合物質を含み、

ここに、該結合物質の各々は遺伝子配列の存在を検出できることを特徴とする遺伝子タイプ分けのための自己アドレス可能な電子デバイス。

2. 該遺伝子配列がヌクレオチド配列である請求項1記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

3. 該ヌクレオチド配列がcDNA配列である請求項2記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

4. 該ヌクレオチド配列がゲノムDNA配列である請求項2記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

5. 該ヌクレオチド配列がmRNA配列である請求項2記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

6. 該ヌクレオチド配列がcRNA配列である請求項2記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

7. 該遺伝子配列がアミノ酸配列である請求項1記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

8. 各々の該複数の位置に結合する各々の該結合物質が同一である請求項1記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

9. 該結合物質がもう1つの該結合物質とは異なる請求項1記載の自己アドレス可能な電子デバイス。

10. 各々が電極よりなる複数の電子工学的にアドレス可能な位置を供し；

結合物質を該複数の位置の各々に付着させ、ここに、該結合物質の各々は遺伝子配列の存在を検出でき；

試料を該複数の位置と接触させ；

該複数の位置の各々において遺伝子配列の不存在または存在を検出することによって該試料の遺伝子プロファイルを決定する工程を含むことを特徴とする電子工学的に制御された遺伝子をタイプ分けする方法。

1.1. 電極を含む電子工学的にアドレス可能な位置を供し；

基質を該位置と接触させ；

該位置を酵素に対して反対の電荷に置き、それにより、該酵素を該位置に濃縮し；

該基質を該位置に付着させ；

該酵素を該位置と接触させ；

該位置を該酵素と反対の電荷に置き、それにより該酵素を該位置に濃縮し；

該酵素を該位置の該基質と反応させる工程を含むことを特徴とするアドレス可能な位置において電子工学的に制御された酵素反応を行う方法。

1.2. 該基質が核酸を含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

1.3. 該酵素が制限酵素、リガーゼ、プロテイナーゼ、グリコシダーゼまたはホスホリラーゼを含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

1.4. 該酵素がDNAポリメラーゼを含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

1.5. 該酵素がRNAポリメラーゼを含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

1.6. 該酵素反応が核酸の酵素消化を含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

1.7. 該酵素反応が核酸の合成を含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

1.8. 該酵素反応がポリペプチドの合成を含むことを特徴とする請求項1記載の方法。



19. (1) 電極を含む電子工学的にアドレス可能な位置を供し；
- (2) 該位置に付着したオリゴヌクレオチドプライマーYを供し；
- (3) 一本鎖核酸Xを該位置と接触させ、ここに、該プライマーYは該核酸Xに特異的にハイブリダイズし；
- (4) 該位置を該核酸Xに対して反対の電荷に置き、それにより、該位置に該核酸Xを濃縮し、該核酸Xを該プライマーYにハイブリダイズさせ；
- (5) 核酸ポリメラーゼを該位置と接触させ；
- (6) 該位置を該ポリメラーゼに対して反対の電荷に置き、それにより、該ポリメラーゼを該位置に濃縮し、該ポリメラーゼが該位置で該プライマーYから核酸Yを合成するのを可能とし；
- (7) 該位置を十分な時間、負の電位に置いて、該核酸Xを該位置から除去し；
- (8) オリゴヌクレオチドプライマーXを該位置と接触させ、ここに、該プライマーXは該核酸Yに特異的にハイブリダイズし；
- (9) 該位置を該プライマーXに対して反対の電荷に置き、それにより、該プライマーXを該位置に濃縮し、該プライマーXを該核酸Yにハイブリダイズさせ；
- (10) 該位置を該ポリメラーゼと反対の電荷に置き、それにより、該ポリメラーゼを該位置に濃縮し、それにより、該ポリメラーゼが該位置の該プライマーXから核酸を合成するのを可能とする工程を含むことを特徴とする核酸の電子工学的に制御された増幅を行う方法。

---

[Translation done.]